



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



# 7. gyakorlat: Áramlási citometria, sejtszeparációs technikák

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet  
Pécs

## A T sejt differenciálódás lépései

1. Elindul vagy a TCR  $\beta$  vagy a  $\gamma/\delta$  láncok átrendeződése.
2. Kialakul a pre-T sejt receptor komplex pT $\alpha$ /TCR $\beta$ /CD3 (pTCR), allél kizárás, IL-7-függő osztódás -  *$\beta$ -szelekció*.
3. Elindul a TCR $\alpha$  gén átrendeződése.
4. Befejeződik a TCR  $\alpha/\beta$  gének átrendeződése, a CD4/CD8 molekulák egyidejű expressziója figyelhető meg: kettős pozitív timocita (DP)
5. A tímusz kortikális epitéliumon (cTEC) megjelenő MHC/peptid komplexek felismerése: – *pozitív szelekció*. – *MHC restrikció*
6. A medulláris epitéliumon és az APC-ken expresszált MHC-peptid komplex felismerése, erős kötése: – *negatív szelekció AIRE szerepe - Tolerancia*
7. Erős, vagy hosszan tartó kapcsolódás a mTEC sejttel meghatározza, hogy CD4 vagy Treg (CD4/CD25+) alcsoport képződik

## T sejt aktiváció és polarizáció

- Az antigen kétféle formában: natív és feldolgozott (DCk) jut a perifériás nyirokszövetekbe
- A naiv és effector T sejtek recirkulációs mintázata eltérő mivel különböző adhéziós molekulákat expresszálnak
- A T sejtek aktivációjához két jel (antigen specifikus + kostimuláció) szükséges
- A T sejt aktiváció következményei:
  1. IL-2 függő klonális proliferáció (CD25 upreguláció + IL-2 termelés)
  2. Th alcsoportok differenciációja (jellemző citokin keverékek, transzkripciós faktorok!)
  3. CTLA-4 expresszió - az aktiváció leállítása
- A T sejt aktivációban részt vevő molekulák terápiás célpontként szolgálhatnak.

# Áramlási citometria gyakorlat 1.

## Gyakorlat menete:

1. 1 cső alvadásgátolt vér a rutin laborból.
2. **Sejfelszíni direkt fluoreszcens jelölés:** Adjatok 50 µl vért a már előkészített antitest-keverékekhez és inkubáljátok 30 percig!
3. **Hemolízis:** Adjatok 1 ml lízis puffert a mintákhoz, inkubáljátok 10 percig!
4. Mosás: Adjatok a mintához 2 ml PBS-t, majd centrifugáljátok 1000 rpm fordulatszámmal 5 percig!
5. Öntsétek le a felülúszót, a pelletet reszuszpendáljátok 500 µl FACS-Fix oldatban! (FACS-Fix: PBS + 0,5% paraformaldehid, **MÉRGEZŐ**)
6. Mérés az intézetben található BD FACSCalibur™ áramlási citométerrel és az eredmények analizálása a BD CellQuest™ programmal.



**HÚZZATOK KESZTYÚT!**

# Áramlási citometria gyakorlat 2.

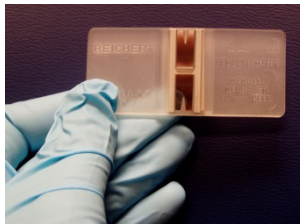
- Az asztaloknál található antitest-keverékek:
  1. Cső: anti-CD3-FITC + anti-CD4-PE
  2. Cső: anti-CD3-FITC + anti-CD8-PE
  3. Cső: anti-CD19-FITC + anti-CD5-PE
  4. Cső: nincs benne antitest = autofluoreszcens kontroll
  5. Cső: nincs benne antitest = autofluoreszcens kontroll
- Használt fluorokrómok (lásd később):
  - **FITC: Fluorescein isothiocyanate**
  - **PE: Phycoerythrin**



BD FACSCalibur™ áramlási citométer

# Az áramlási citometria (flow cytometry) definíciója

- Mitől citometria?
  - Sejtek paramétereinek vizsgálatára alkalmas módszer. (pl. sejtszám, méret, granularitás, fehérjék jelenléte a felszínen vagy a citoplazmában, DNS-tartalom, stb., lásd a következő diákon)
- Mitől áramlási?
  - Folyadékban szuszpendált sejteknek vagy egyéb partikulumoknak lézerefény és detektorok előtti áramoltatásán alapul. (lásd a következő diákon)
- Mire jó?
  - Egy nagyobb sejtmennyiség **gyors, multiparaméteres** vizsgálatát teszi lehetővé, vagyis amellet, hogy rövid időn belül sok sejtet vizsgál, egyetlen vizsgált sejtről egyidejűleg több paramétert is megad. (méret, granularitás, jelöléstől függően egyéb, lásd a következő diákon)

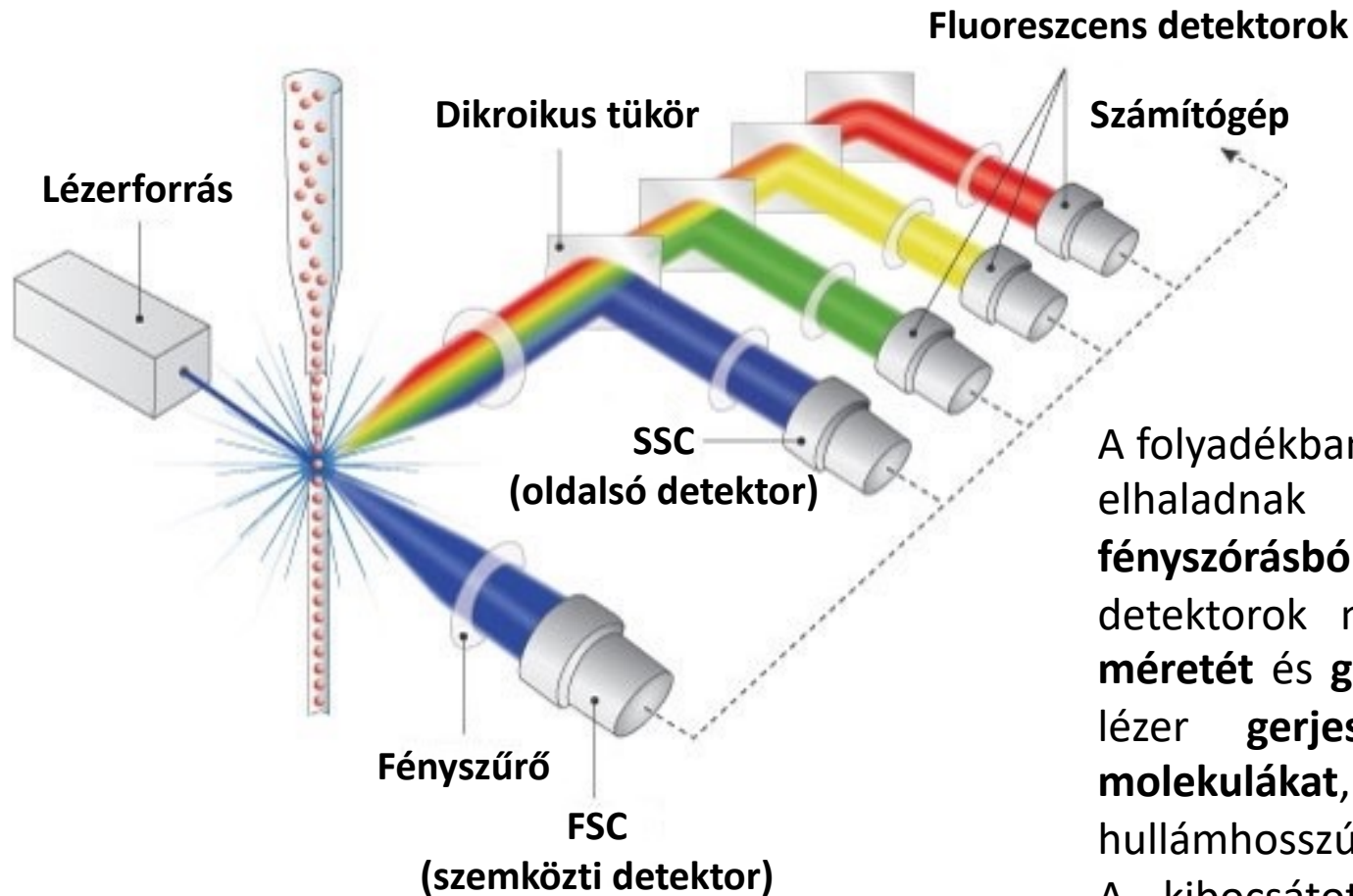


Egy hemocitóméter:  
Mikroszkóp alatt a vizsgáló megszámol percenként kb. 100-200 sejtet.



BD FACSCanto™ II áramlási citóméter:  
Egy másodperc alatt akár 10.000 sejtet is képes lemérni.<sup>[1.]</sup>

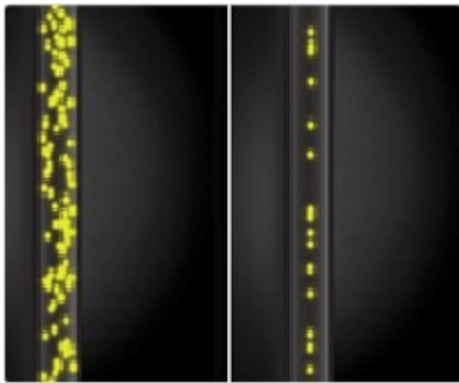
# Az áramlási citometria lényege



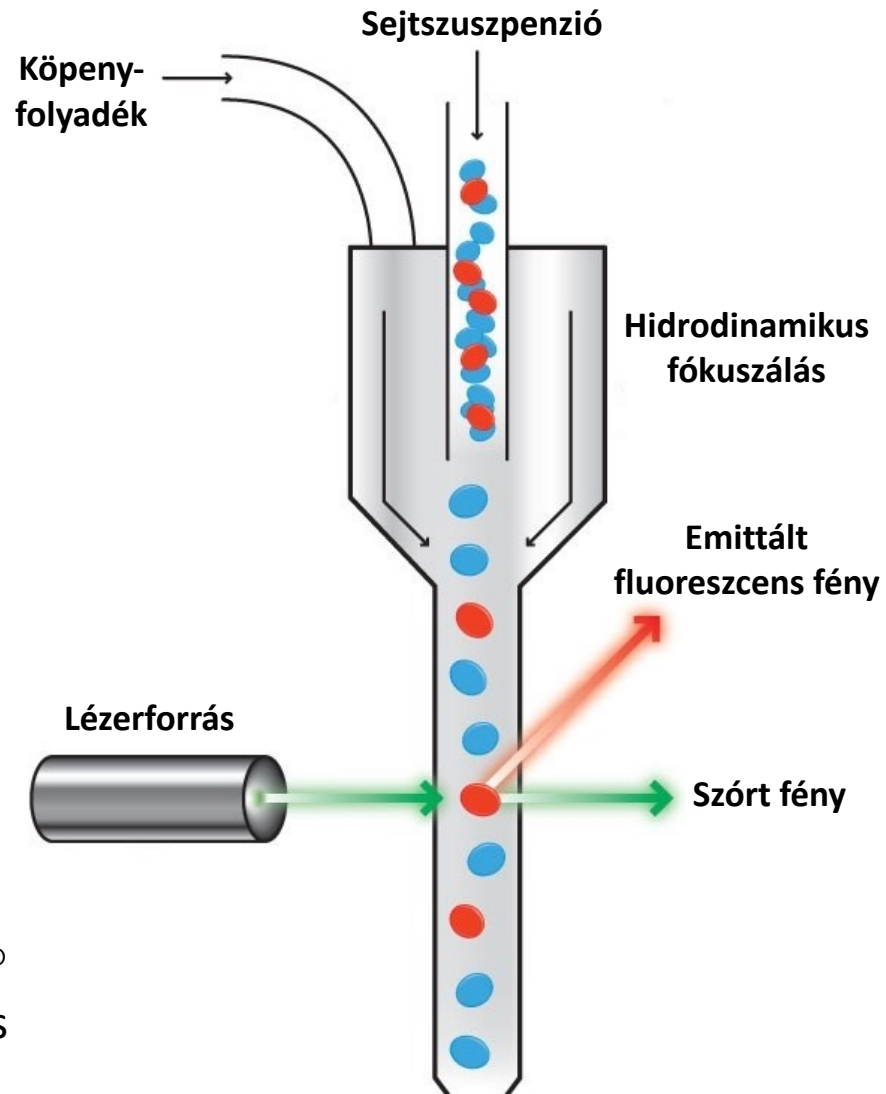
A folyadékban lévő sejtek **egyesével** elhaladnak a lézer előtt. A **fényszórásból** az FSC és SSC detektorok meghatározzák a sejt **méretét** és **granularitását**, illetve a lézer **gerjeszti** a **fluoreszcens molekulákat**, amik a rájuk jellemző hullámhosszúságú fényt **emittálják**. A kibocsátott fluoreszcens fényt **dikroikus tükrökkel** vagy filterekkel terelik a megfelelő **detektorhoz**.<sup>[2.]</sup>

# Hidrodinamikus fókusztálás

- A folyadékban lévõ sejteket a hozzájuk áramoltatott **köpenyfolyadék** (angolul sheath fluid, ez általában PBS) sorba rendezi. A sejtek így egymás után, **egyesével** haladnak egy **kapillárisban**. A **lézerfény** erre a kapillárisra fókusztált.
- Ultrahang is használható a sejtek fókusztálására (akusztikus fókusztálás):

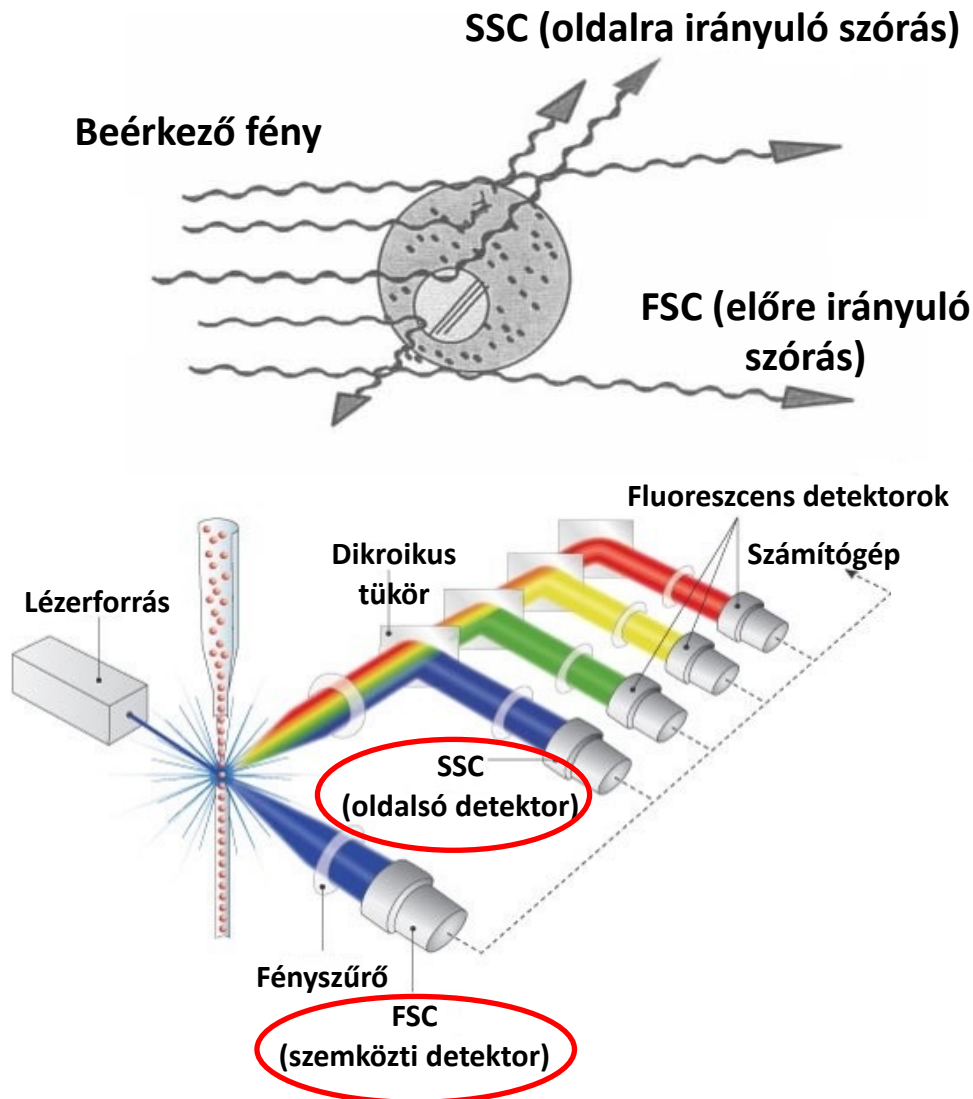


Az akusztikus fókusztálást használó Attune<sup>®</sup> áramlási citométer fókusztálás nélkül (bal) és fókusztálással (jobb).





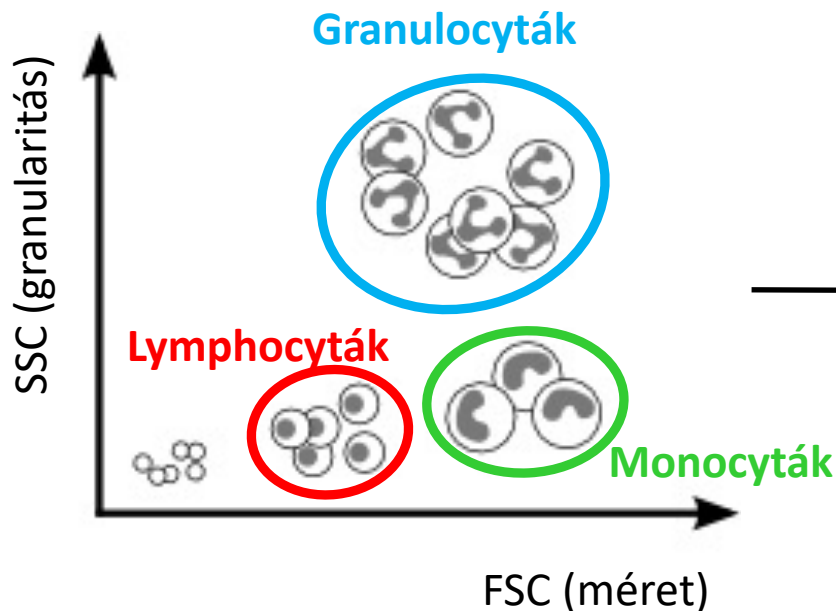
# Az FSC és SSC detektorok



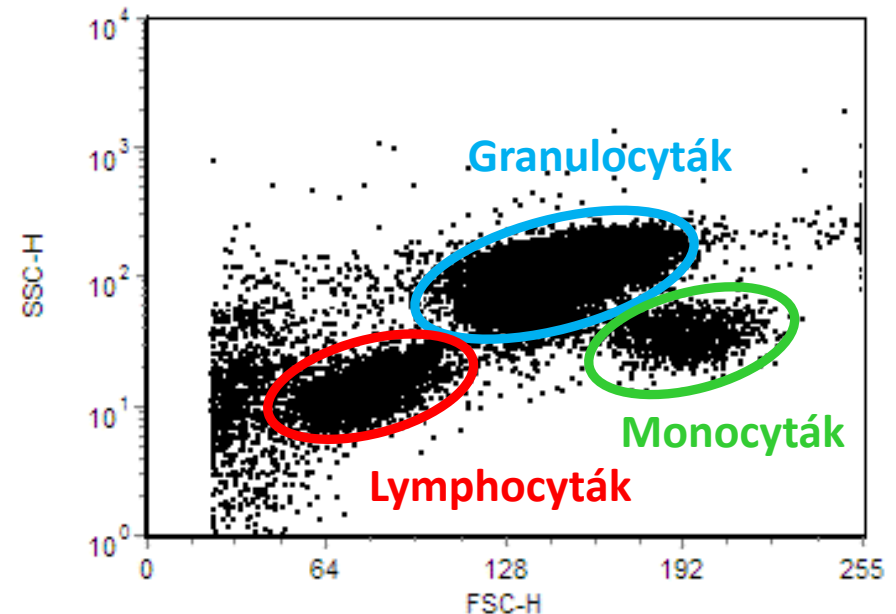
- A **FSC** (forward scatter) detektor a kibocsátó lézerforrással nagyjából szemben található, a sejt felszíne által okozott fényszórást méri, ami a sejt **méretével arányos**.
- Az **SSC** (side scatter) detektor a sejtre érkező lézerefényhez képest oldalt található, a sejt belsejében előforduló membránnal körülvett struktúrák (pl. granulumok, mitokondriumok, stb.) által okozott szórást méri, ami a sejt **granuláltságával arányos**.

# Dot plot bemutatása FSC és SSC alapján

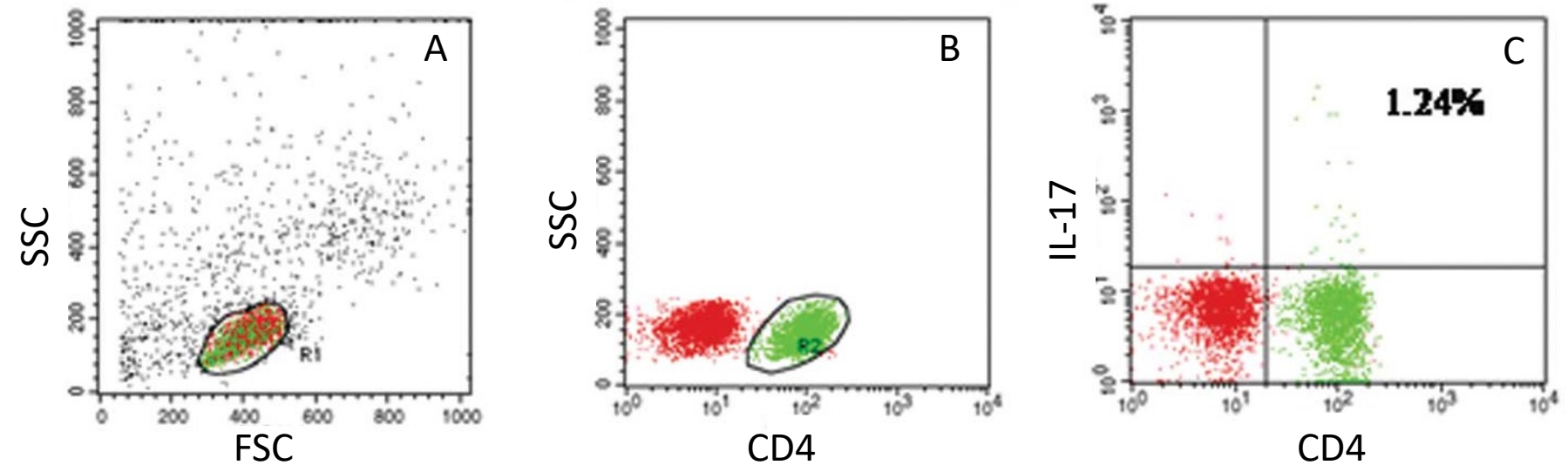
A **dot plot** (dot = pont, plot = kép) az áramlási citometriás vizsgálatok egy jellegzetes megjelenítési formája. Egy **kéttengelyű koordináta-rendszerben** helyezi el a sejteket a beállított két paraméter függvényében. Minden egyes látott pont egy sejtnek felel meg. Az azonos sejtcsoportba tartozó sejtek nagyobb halmazokat, **sejtpopulációkat** alkotnak. Az egyes populációk ezt követően kiválaszthatók („**kapuzás**”) és külön-külön vizsgálhatók más paraméterekre.



Humán perifériás vér dot ploton:



# Példa a kapuzásra

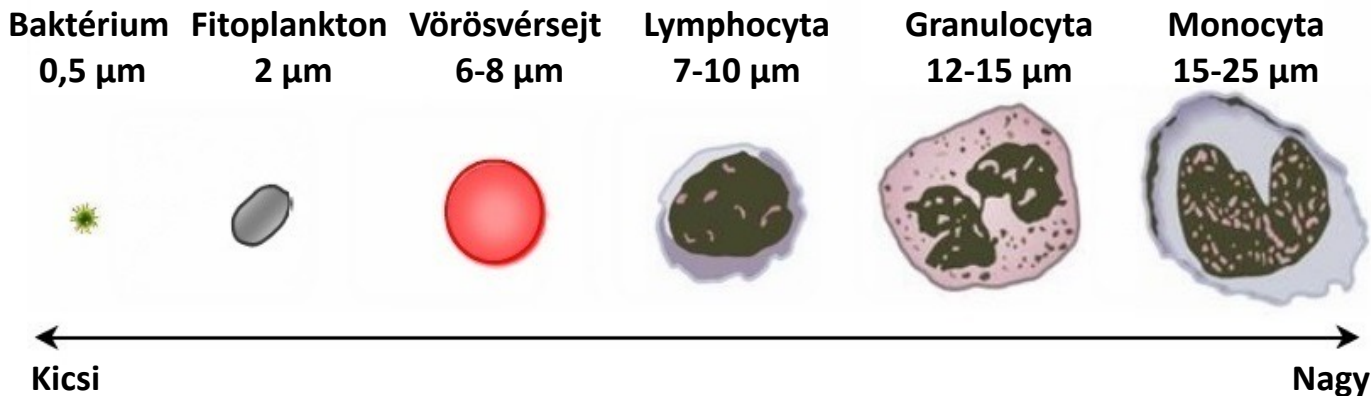


Szerették volna a mintában meghatározni a Th17 sejtek (lásd 2. gyakorlat) arányát. A vért fluoreszcensen jelölték (lásd következő diákon) CD4-re, és IL-17-re, majd a mintát áramlási citométerrel vizsgálták.

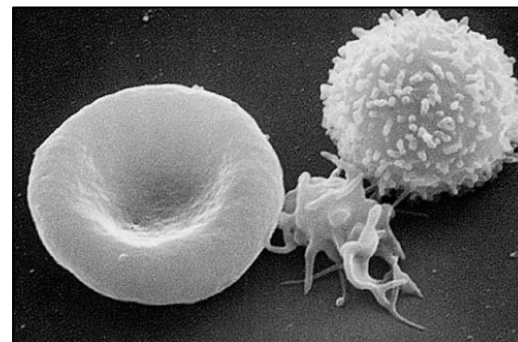
- **A:** Méret (FSC) és granularitás (SSC) alapján kiválasztották a lymphocytákat. (R1 kapu)
- **B:** A lymphocytákon belül kiválasztották a CD4 pozitív sejteket. (R2, zöld kapu)
- **C:** A lymphocytákon belül vizsgálták az CD4+ és IL-17+ sejtek arányát. (jobb felső kvadráns, 1,24%-a az összes lymphocytának.)

# Áramlási citometria és a vörösvérsejtek

- A vörösvérsejtek zavarják a vérminták vizsgálatát, mert:
  - **Hasonló mérettartományba** esnek, mint a lymphocyták.
  - A lymphocytákhoz képest sokkal **több van belőlük**, ezért elfedik a lymphocytákból érkező jelet.

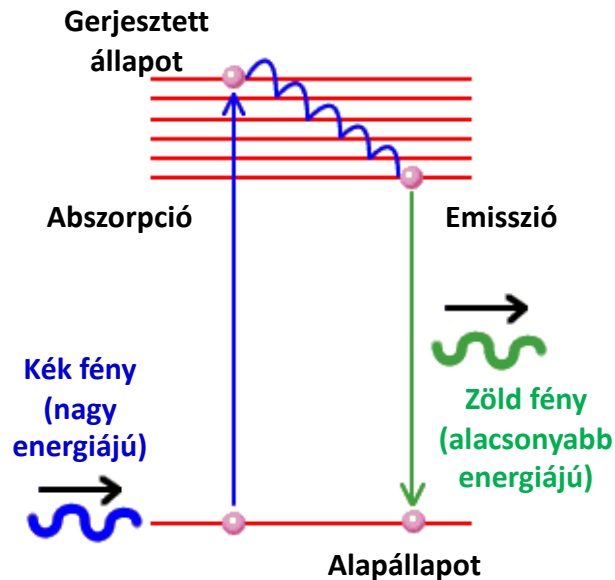


- Módszerek a vörösvérsejtek eliminálására:
  - **Hemolízis**
  - **Ficoll-grádiens centrifugálás** (lásd később)

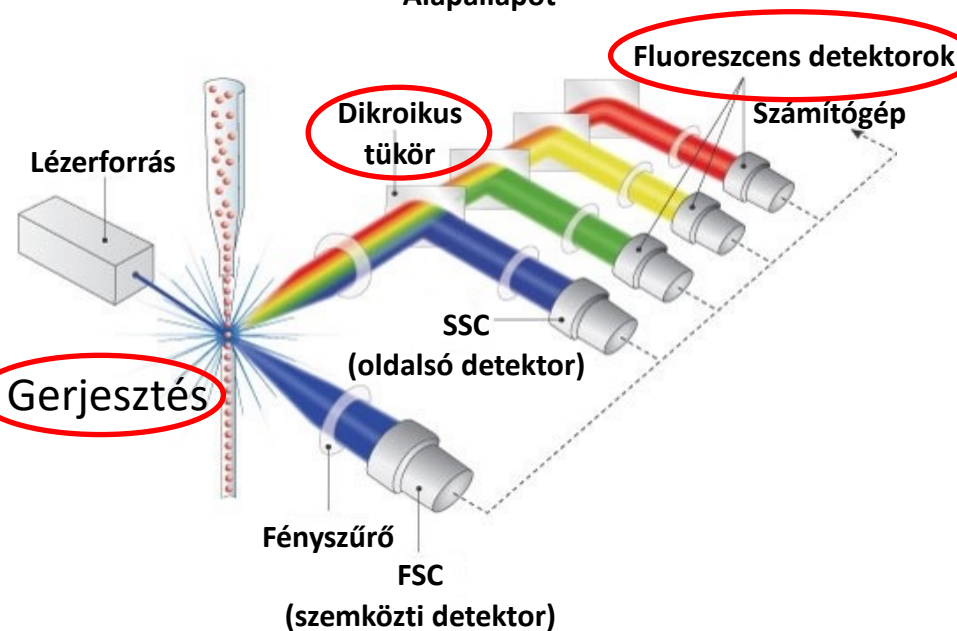


Vvt, tct és egy lymphocyta

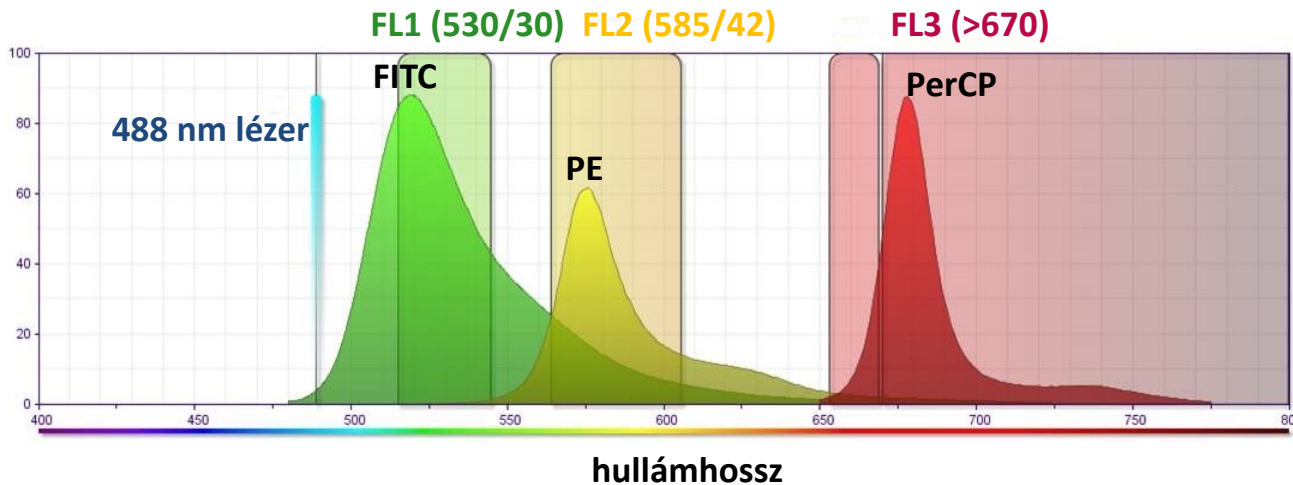
# Immunfluoreszcens jelölés



A méret és a granularitás mellett a sejtekből érkező fluoreszcens jel is detektálható. A lézer **gerjesztő fényként** gerjeszti a jelöléshez használt antitesthez konjugált **fluorokrómot**, ami valamilyen rá jellemző hullámhossz tartományban (**emissziós spektrum**) fényt bocsát ki. A különböző hullámhosszú fluoreszcens fényt **dikroikus szűrőkkel** vagy **tükrökkel** el lehet különíteni és a nekik megfelelő **detektorokba** terelhetők.



# A fluoreszcens spektrum



A BD FACSCalibur lézerei:<sup>[3.]</sup>

488 nm argon lézer

635 nm vörös dióda lézer

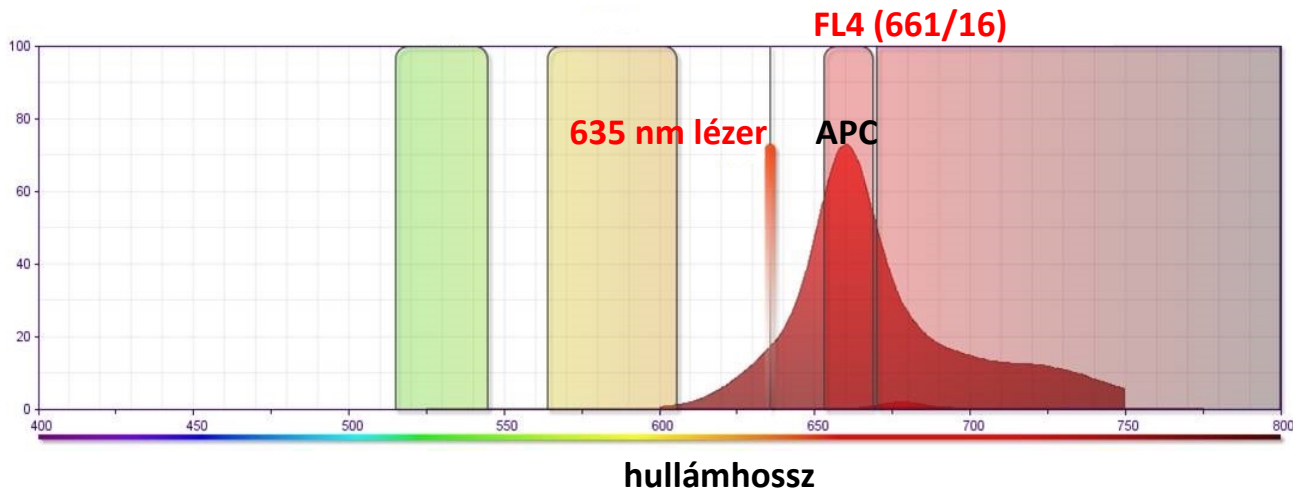
A BD FACSCalibur detektorai:

**FL1:** 515-545 nm (530/30)

**FL2:** 564-606 nm (585/42)

**FL3:** >670 nm

**FL4:** 653-669 nm (661/16)



A lézerekkel ellentétben, amik egy fix hullámhosszúságú fénynyalábot bocsátanak ki, a fluorokrómok egy rájuk jellemző **emissziós spektrummal** rendelkeznek, amik sokszor jelentősen **átfednek** egymással.

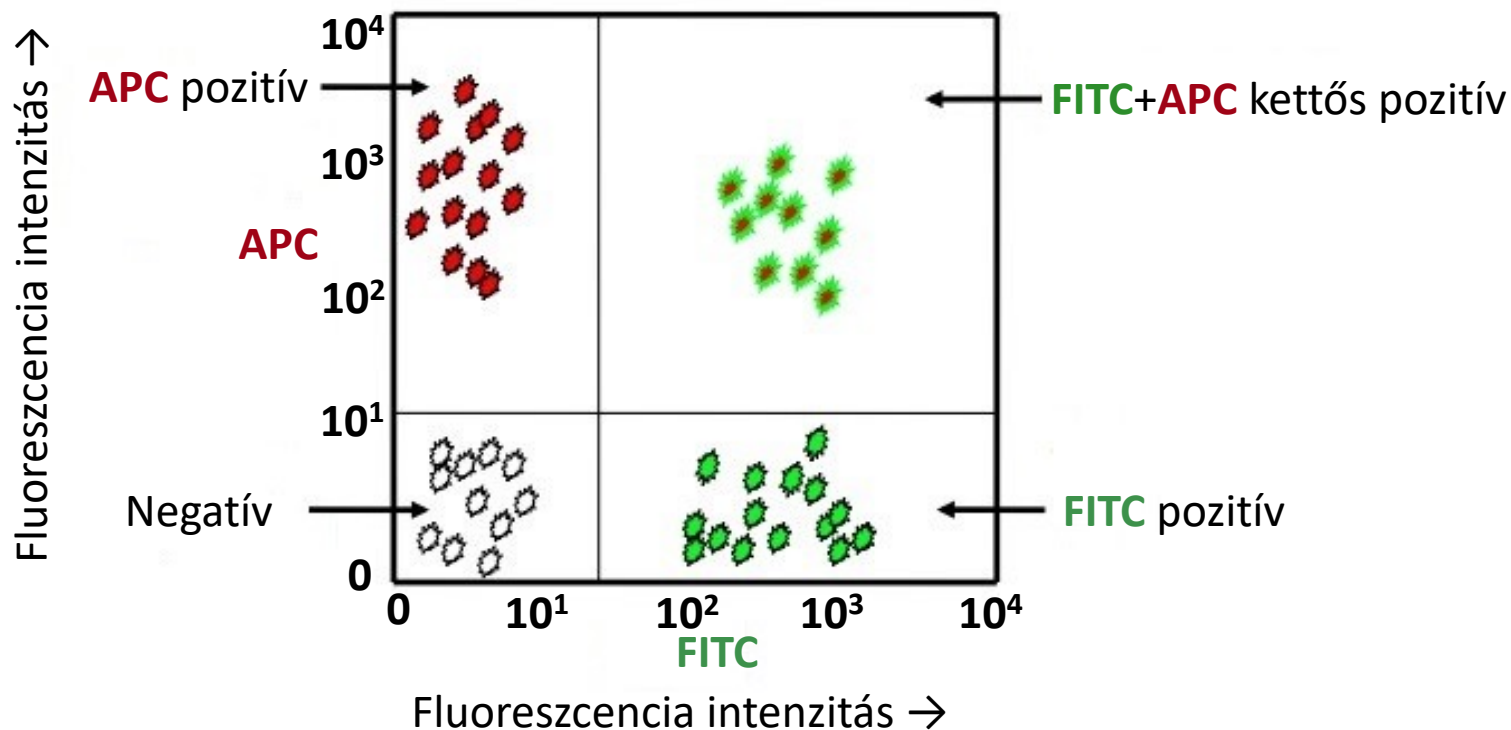


# Fluorokrómok

Fluorokróm	Színe	Gerjesztési hullámhossz		Emissziós hullámhossz
		max. (nm)	Gerjesztő lézer (nm)	max. (nm)
Hoechst 33342	Blue	350	355, 375	461
Brilliant Violet™ 421	Blue	407	405	421
BD Horizon™ V450	Blue	404	405	448
Pacific Blue™	Blue	401	405	452
BD Horizon™ V500	Green	415	405	500
AmCyan	Green	457	405	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578
Brilliant Violet™ 605	Orange	407	405	602
BD Horizon™ PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612
PI	Orange	351	488, 532, 561	617
7-AAD	Red	543	488, 532, 561	647
APC†	Red	650	633, 635, 640	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	633, 635, 640	668
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785
APC-Cy7	Infrared	650	633, 635, 640	785
BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785

Ugyanabban a mintában ugyanazon lézer által gerjesztett és azonos színű fluorokrómok használata kerülendő, mert nem lesznek elkülöníthetőek a vizsgált antigének. (Gyakran használt kombináció: **FITC** + **PE** + **APC**)

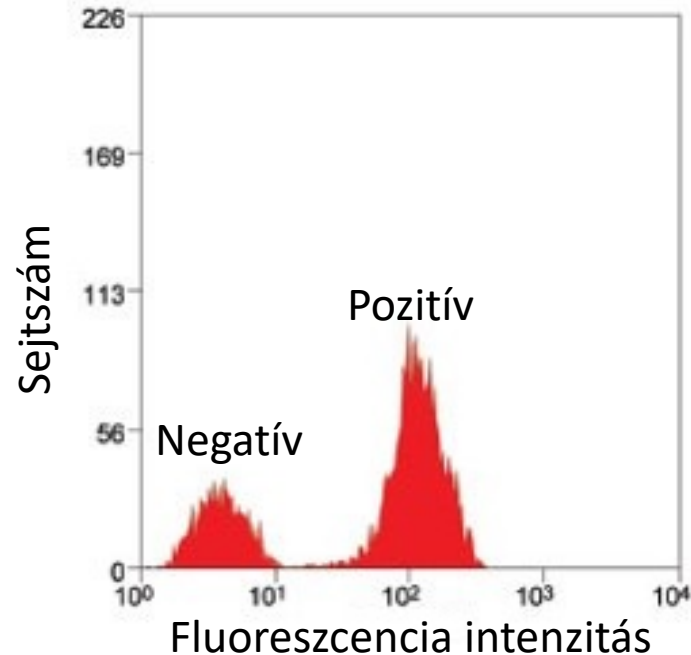
# Fluoreszcencia megjelenítése dot ploton



A vizsgálat **kvantitatív**, a mért fluoreszcencia intenzitások számban kifejezhetőek. (=A **pozitivitás mértéke** is meghatározható.)



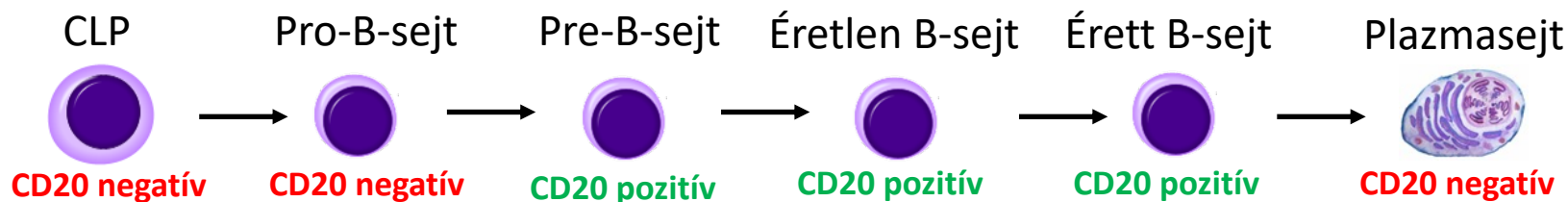
# Példák egyéb megjelenítési formákra



**Hagyományos hisztogram:** A vízszintes tengelyen az adott detektorban mért fluoreszcencia intenzitás (=jelerősség), a függőleges tengelyen pedig a sejtek száma látható. A megadott példában elkülöníthető egy alacsony fluoreszcenciájú negatív és egy magasabb fluoreszcenciát adó pozitív sejtpopuláció.

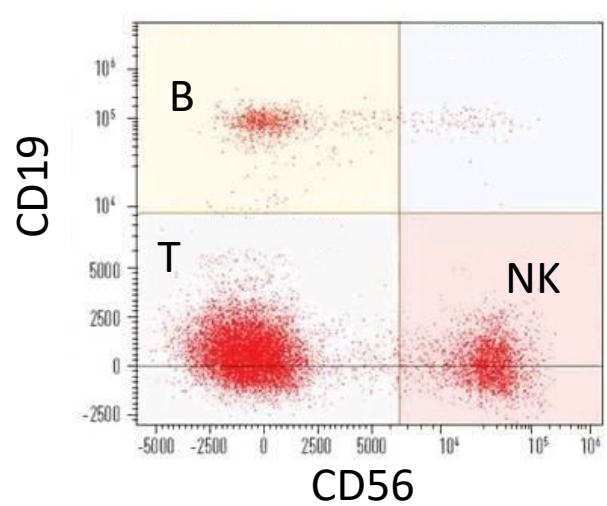
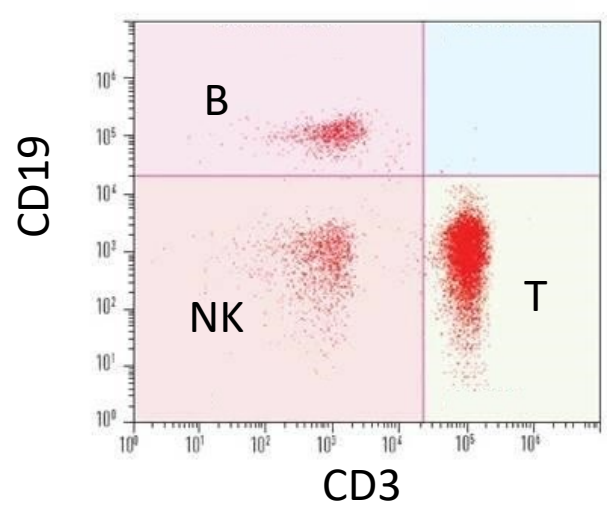
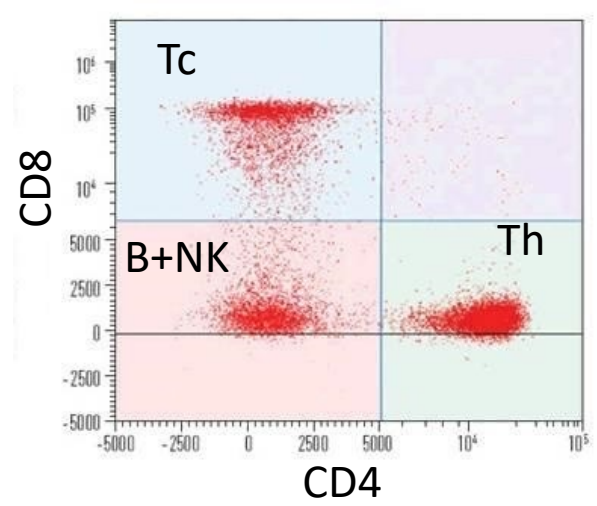
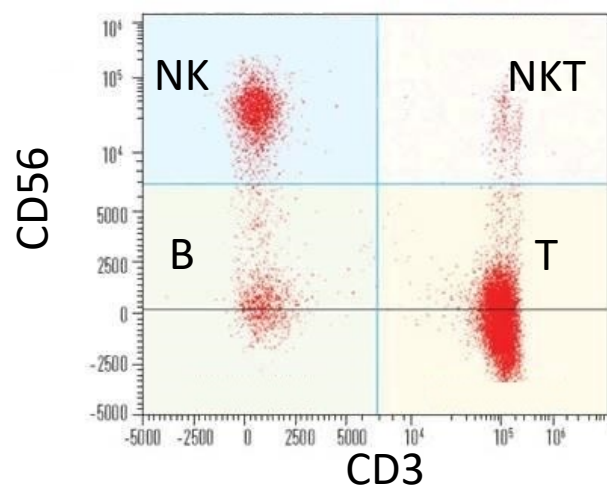
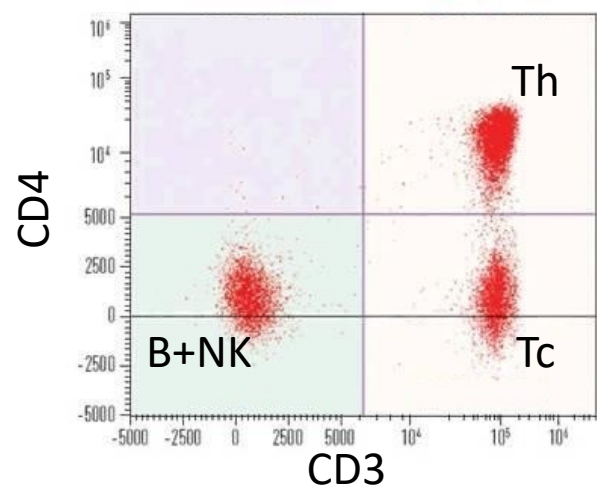
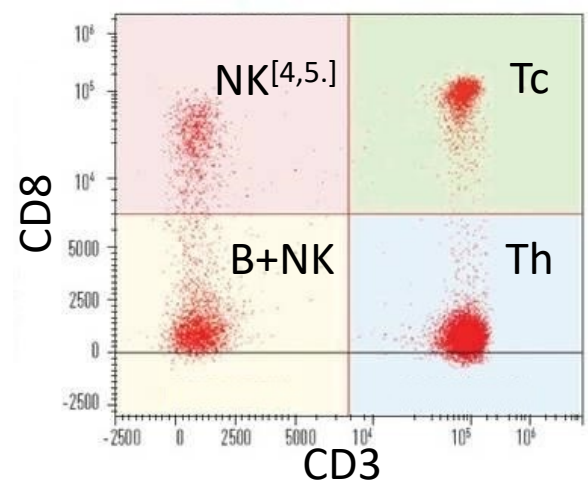
# A CD markerek típusai

- **Sejtvonal markerek:** Kizárólag egy sejtvonalra jellemzőek, az adott vonal összes sejtjén jelen vannak, de más sejteken nem találhatók meg.
  - Pl.: CD3 → minden T-sejten      CD19 → minden B-sejten
- **Érészi markerek:** A sejterés eltérő fázisaiban különbözik az immunfenotípus, egyes molekulák csak a sejterés bizonyos fázisaiban vannak jelen, később eltűnnek, más molekulák csak az érett sejteken találhatók meg, stb.
  - Pl.: CD20 (B-sejt marker is egyben, más sejteken nem fordul elő)<sup>[1.]</sup>



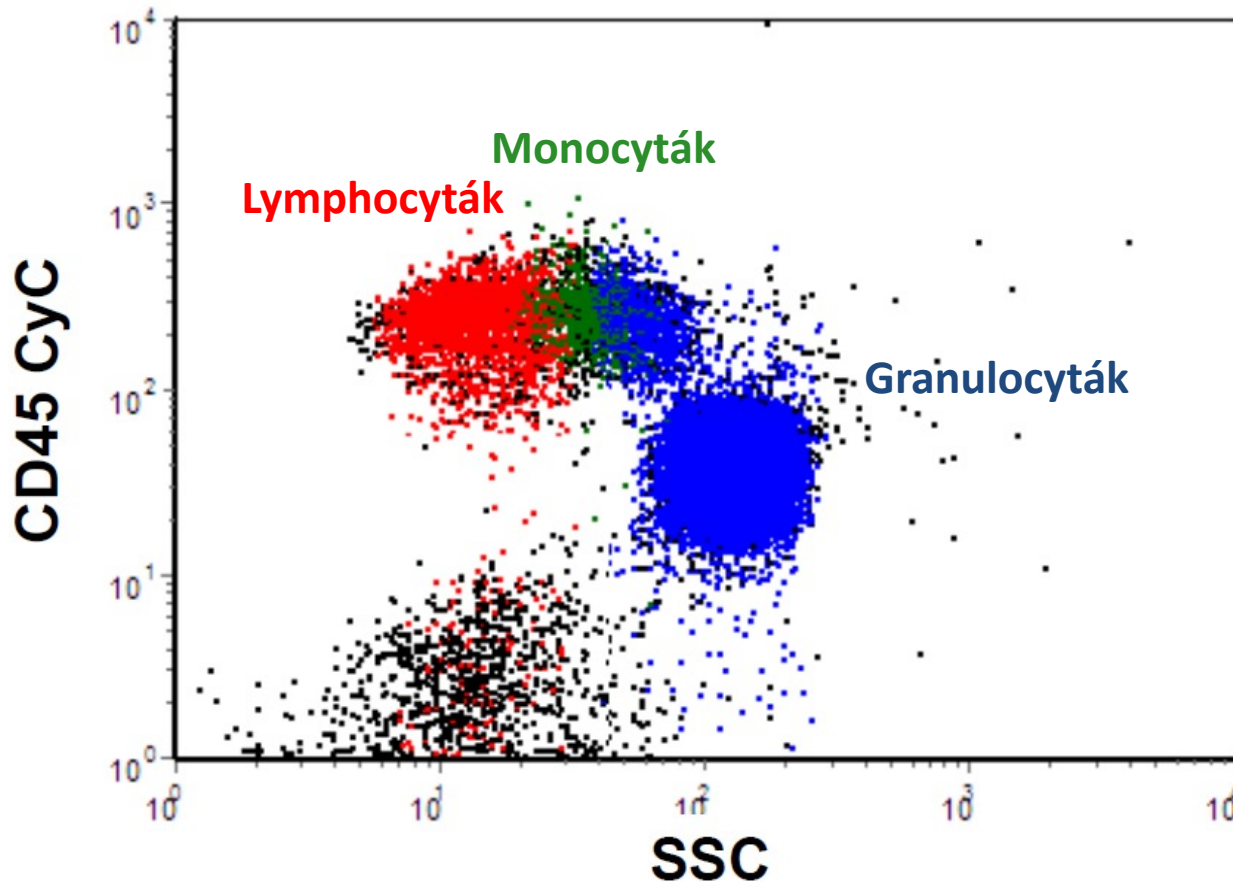
- **Aktivációs markerek:** Nyugvó sejteken nincsenek, vagy csak nagyon kis mennyiségben vannak jelen, de a sejttaktiváció hatására megjelennek, pl.:
  - CD25 (az interleukin-2 receptorának az alfa lánc, IL-2R $\alpha$ , lásd később)
  - CD80 és CD86 (B7-1 és B7-2, az antigén prezentáló sejteken található ún. kostimulációs molekulák, lásd később)

# Normál humán vér lymphocyta alcsoportjai



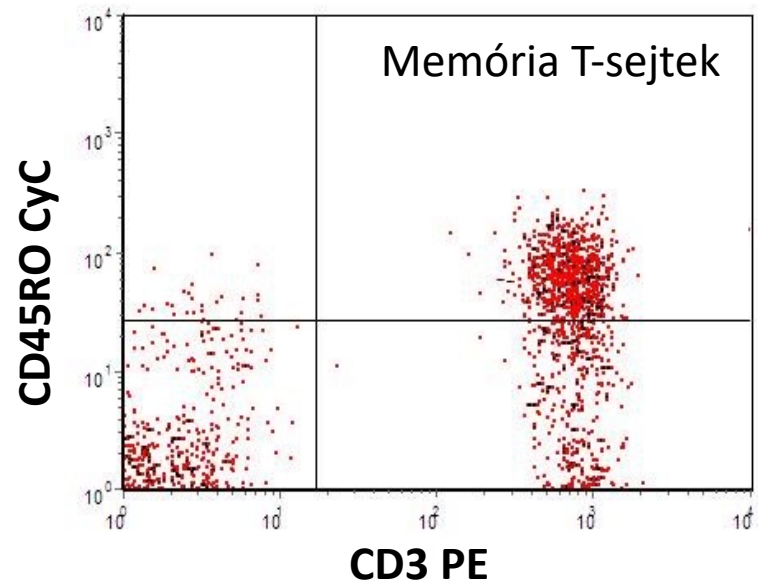
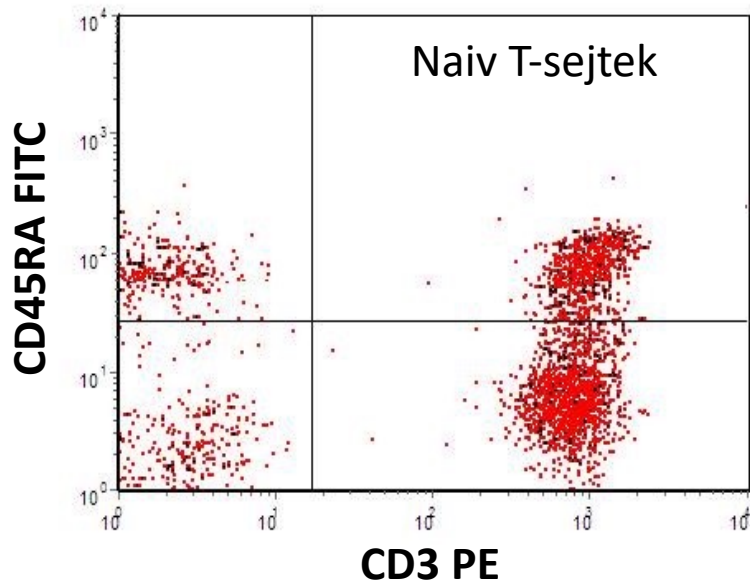
Emlékeztető: **CD3** → T-sejt, **CD4** → Th sejt, **CD8** → Tc sejt, **CD19** → B-sejt, **CD56** → NK-sejt

# CD45 humán perifériás vérben



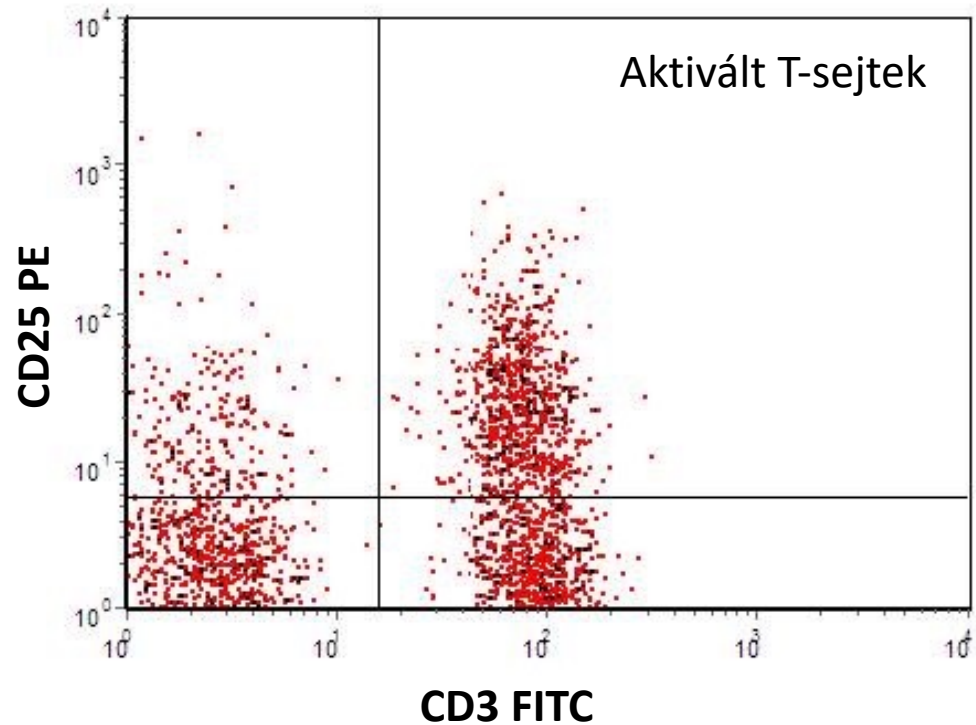
A **CD45** molekula **minden fehérvérsejten** megtalálható, ún. pan-leukocita marker.

# CD45RA és RO izoformák kimutatása humán vérben



**CD45** funkciója: Sejtmembránba ágyazott **foszfatáz**, számos izoformája ismert, a **CD45RA** a naiv T-sejtekre, a **CD45RO** a memória T-sejtekre jellemző.<sup>[6.]</sup> (részletesen lásd előadáson)

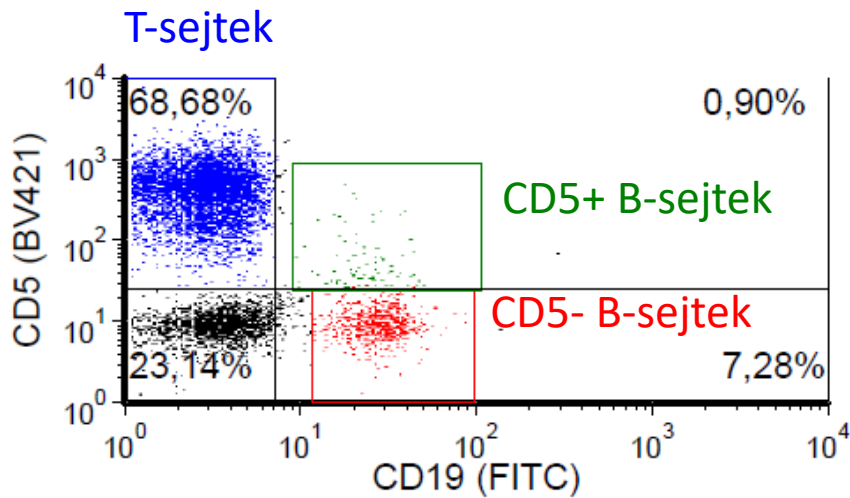
# CD25 expresszió humán vér T-sejtjeiben



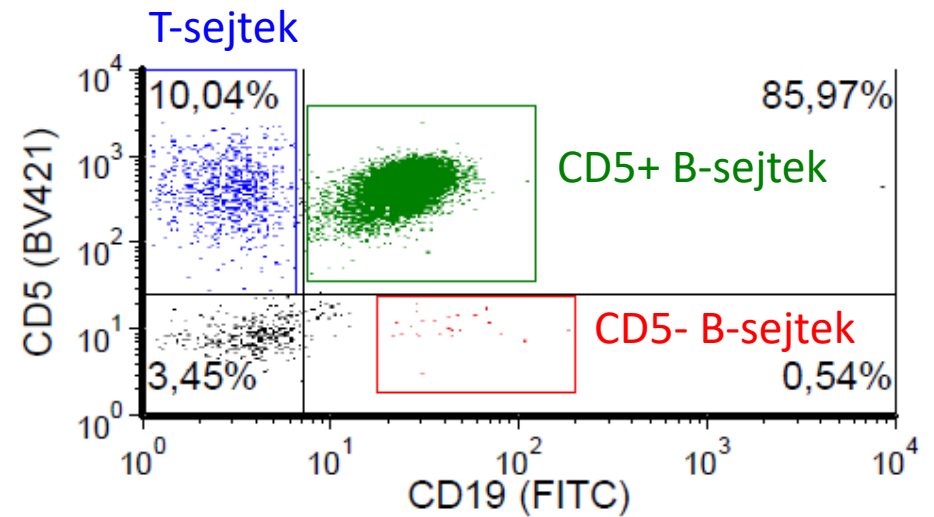
**CD25:** Az interleukin-2 receptorának alfa lánca (IL-2R $\alpha$ ), mely aktivált lymphocytákon jelenik meg.<sup>[7.]</sup> (részletesen lásd előadáson)

# Humán CD5+ B-sejtek

Egészséges egyén perifériás vére:



B-sejtes chronicus lymphocytás leukaemia (B-CLL):



# Az áramlási citometria jelentősége 1.

- Meghatározható a mintában található sejtek immunphenotípusa (**immunphenotipizálás**):
  - Malignus **hematológiai betegségek** diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája<sup>[8, 9.]</sup>
  - **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája<sup>[10.]</sup>
  - **Autoimmun betegségek** követése
  - **Transzplantáció** előtti és utáni állapotok követése<sup>[11.]</sup>
  - **HLA haplotípus** meghatározása<sup>[12.]</sup> (lásd később)
  - **Fertőző betegségek** diagnosztikája és követése
- **Kvantitatív** mérési lehetőségek:
  - A vizsgált antigént hordozó **sejtek arányának** mérése
  - Az **antigén expressziójának** meghatározása a vizsgált sejtpopulációban
- **DNS és RNS tartalom mérése:**<sup>[13.]</sup>
  - Apoptózis vizsgálata
  - Sejtciklus vizsgálata
  - Reticulocyták számának meghatározása
  - Aneuploidia kimutatása



# Az áramlási citometria jelentősége 2.

- **Funkcionális tesztek:**
  - **Phagocytáló képesség vizsgálata**<sup>[14.]</sup>
  - **Intracelluláris kalcium szint** mérése<sup>[15.]</sup>
  - Intracelluláris pH meghatározása
  - Enzim mennyiség és aktivitás meghatározása
  - Chemotaxis vizsgálata
  - Reaktív oxigén szabadgyökök termelésének meghatározása
  - Proliferációs index mérése
- **Citokin szint mérés**<sup>[16.]</sup> (CBA, lásd később a szerológiai teszteknel)
- **Sejtszeparálás**<sup>[17.]</sup> (Sejt szortolás, lásd később)
- Hematológiai automaták → **vérkép** (fluoreszcens jelölés nélkül)

A következőkben láthattok pár **szemléltető diát** az áramlási citometria felhasználási területeiről. Az azokon szereplő anyagot természetesen **nem kérjük számon**, azonban a főbb **felhasználási területeit** ismerni kell és **tudnotok kell dot plotot elemezni!**

# Példa immunphenotipizálásra 1.

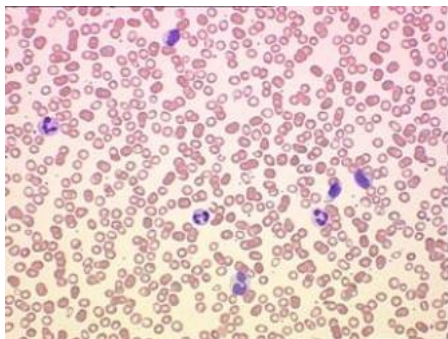
A betegnél vérvétel során kórosan emelkedett lymphocytaszámot (lymphocytosis) találtak.



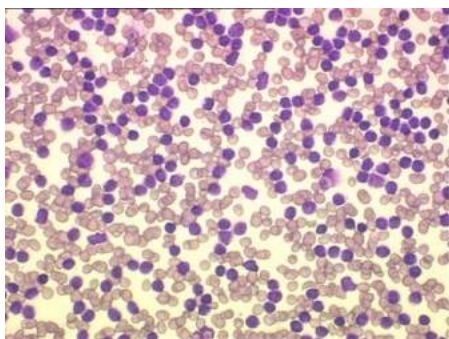
Áramlási citometria



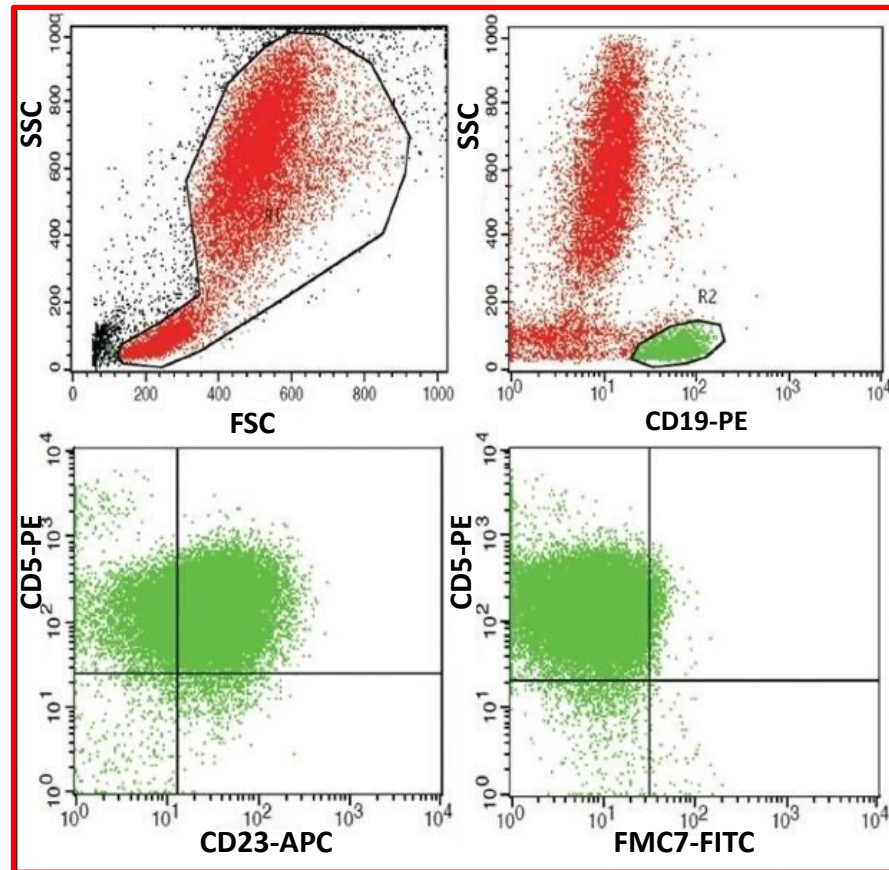
Kérdés: Milyen sejtek ezek?



Normál vérkenet



A beteg kenete



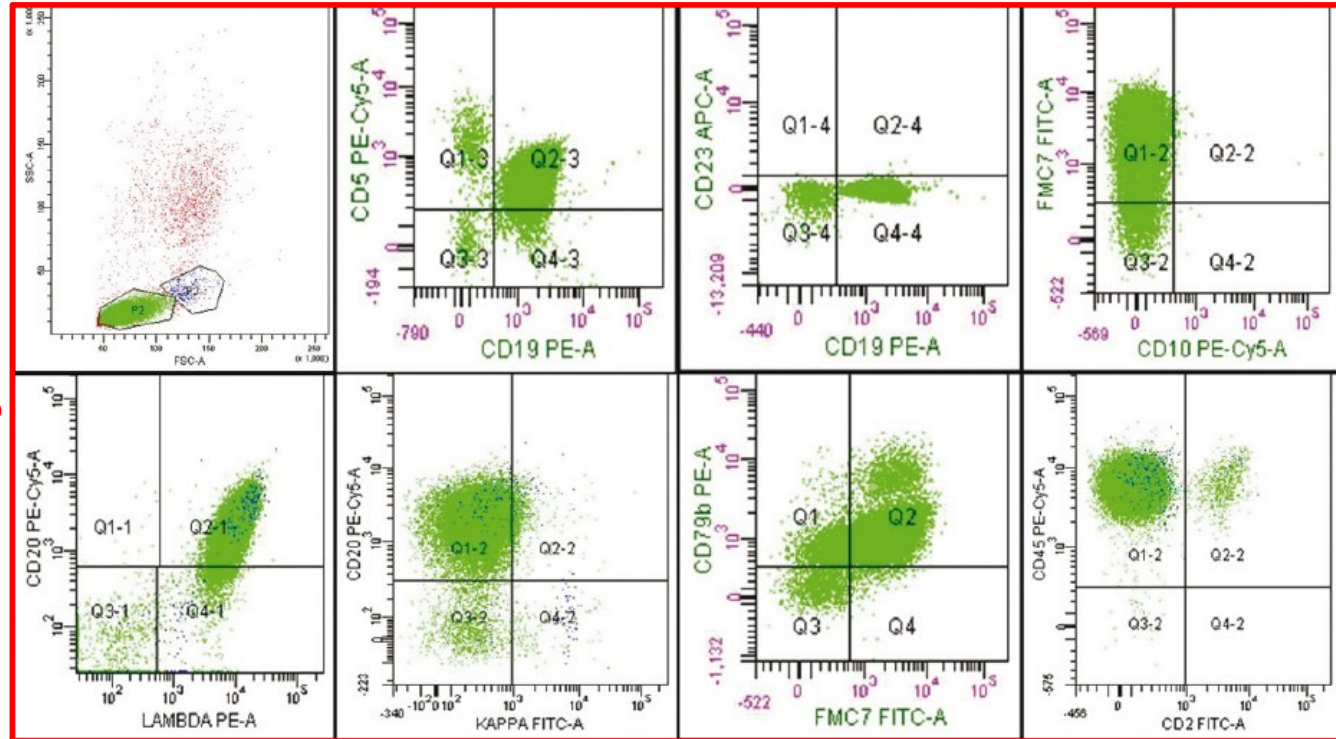
Kapott immunphenotípus:  
**CD5+/CD23+/CD19+/FMC7-**



**Diagnózis:** B-sejtes chronicus lymphocytás leukaemia  
(B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia)

# Példa immunphenotipizálásra 2.

Lymphocytosis és nyirokcsomó-megnagyobbodás (lymphadenomegalia) miatt vizsgálták a beteget.



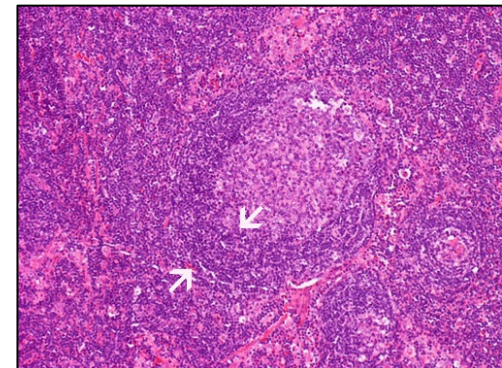
Kérdés: Milyen sejtek ezek?

Kapott immunphenotípus:

- **CD5+**
- **CD19+**
- CD20+
- CD45+
- CD79b+
- **FMC7+**
- Lambda+
- **CD10-**
- **CD23-**

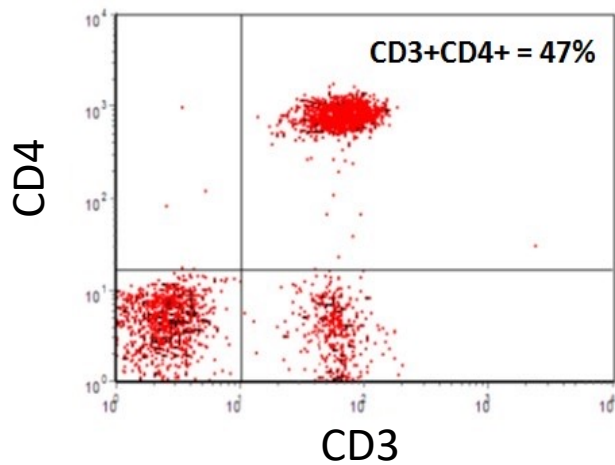
**Diagnózis:** Köpenysejtes lymphoma (MCL, Mantle cell lymphoma), leukaemiás vérképpel

Kiszélesedett köpenyzóna (mantle zone) egy nyiroktüsző körül MCL-ben. (fehér nyilakkal jelölve, H&E festés)



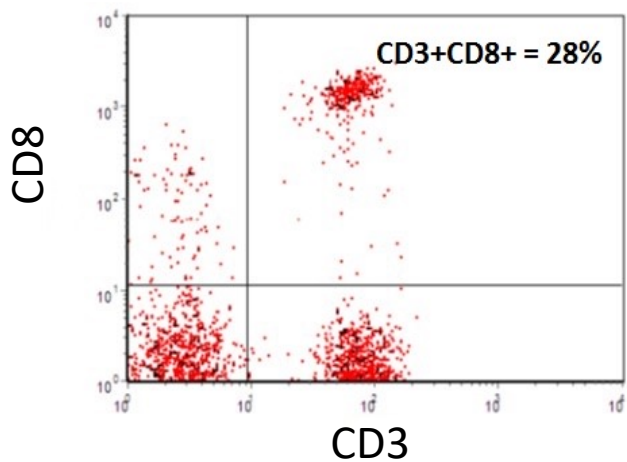
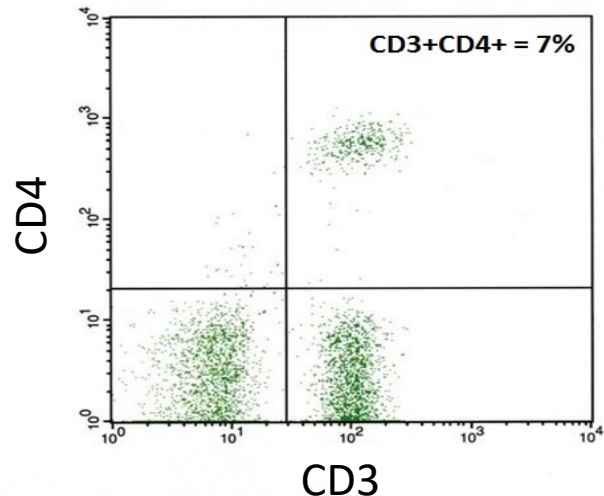
# Példa immunhiány követésére

CD4/CD8 arány egy egészséges  
egyén perifériás vérében:

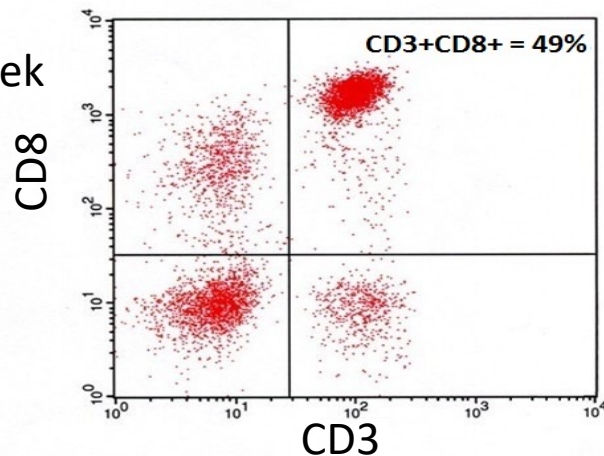


Helper T-sejtek

Kóros CD4/CD8 arány HIV  
fertőzött betegben:



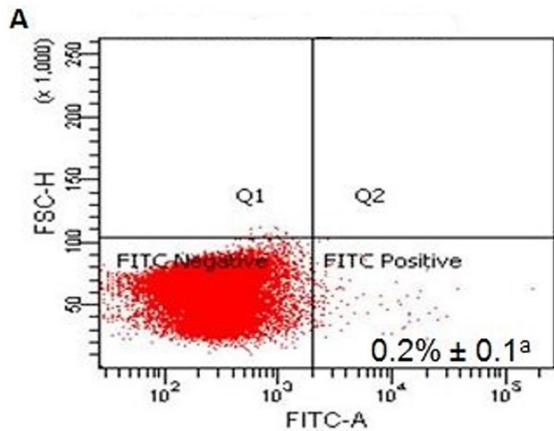
Cytotoxicus T-sejtek



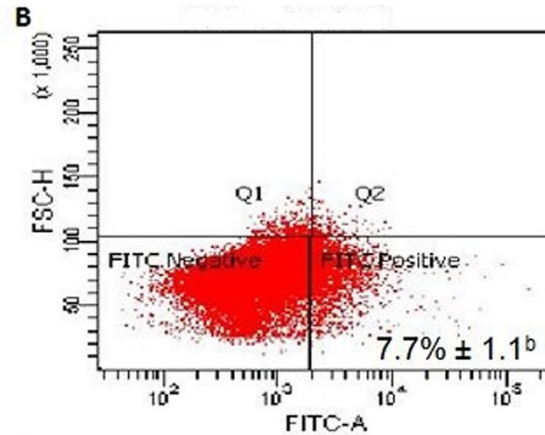


# Példa phagocytosis vizsgálatára

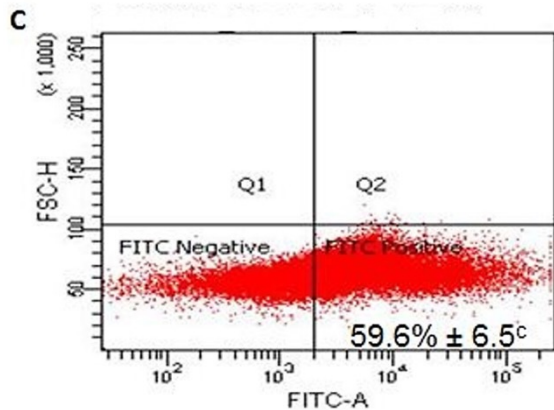
**A:** Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyök nélkül



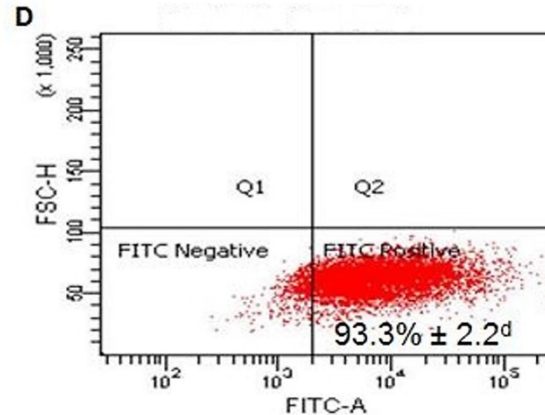
**B:** Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



A kezelések hatására fokozódik a macrophagok phagocytáló képessége.



**C:** Növényi poliszachariddal kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

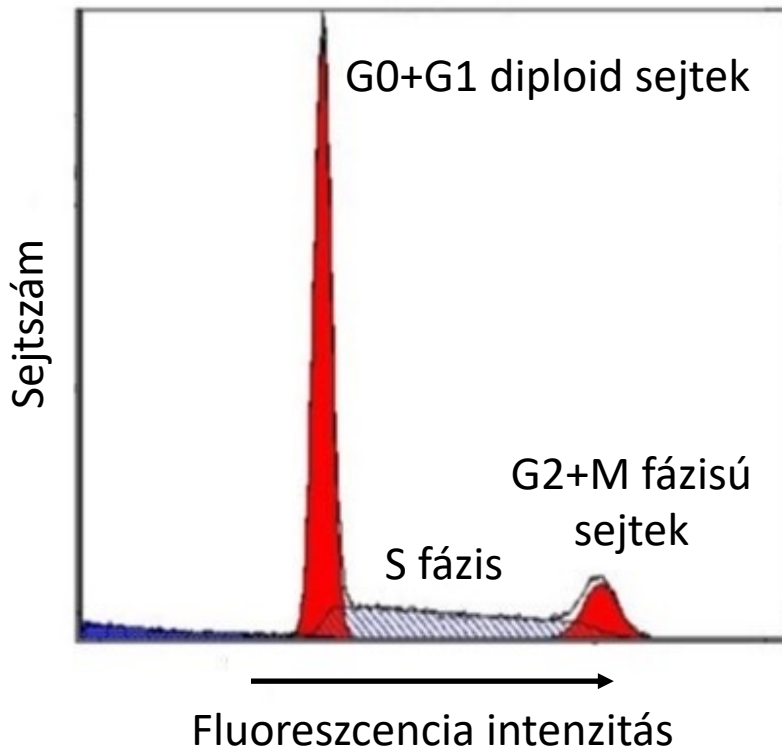


**D:** LPS-el kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

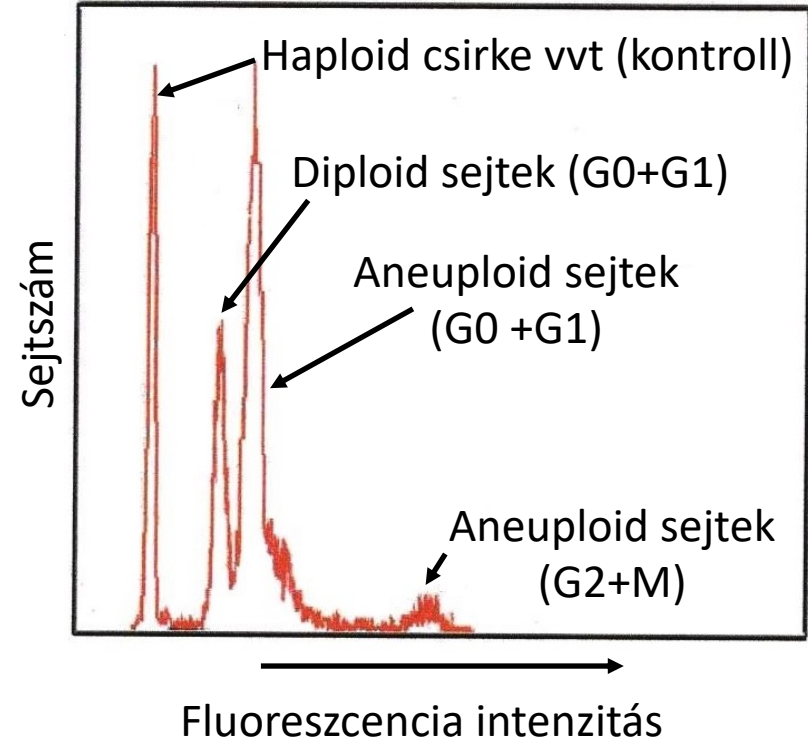
# DNS tartalom vizsgálata tumorokban

DNS-t festő fluorokrómokkal kezelik a sejteket, majd megméri a fluoreszcencia intenzitást.

Normális állapot:



Májbiopszia hepatocellularis carcinomából:[18.]



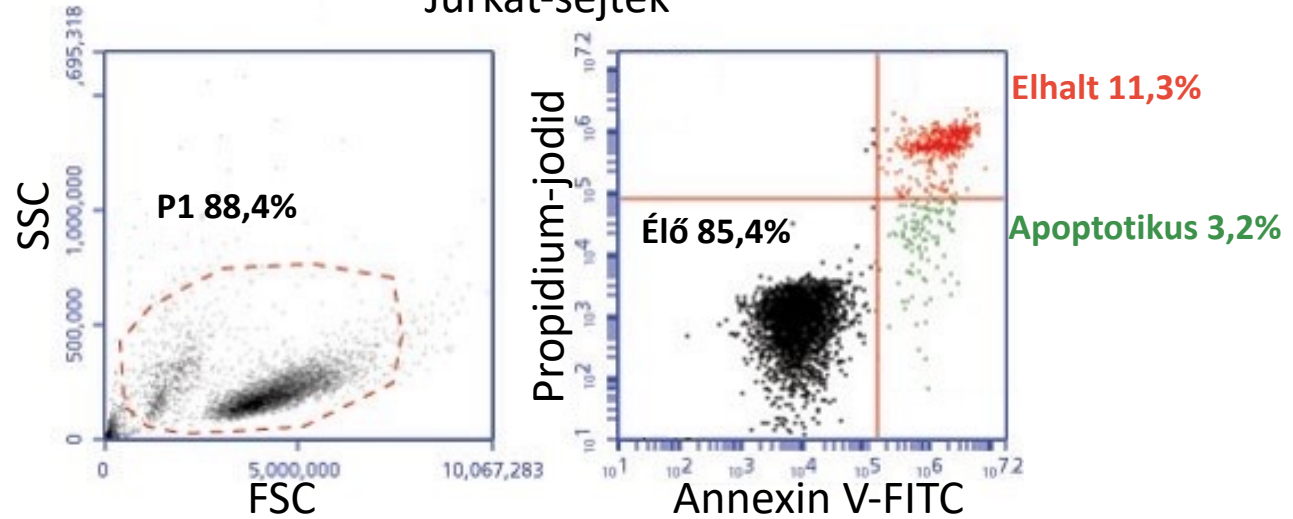
Aneuploidia: Abnormális kromoszómaszám (pl. 60 a 46 helyett G0 fázisú sejtekben)

# Példa sejt életképesség vizsgálatára

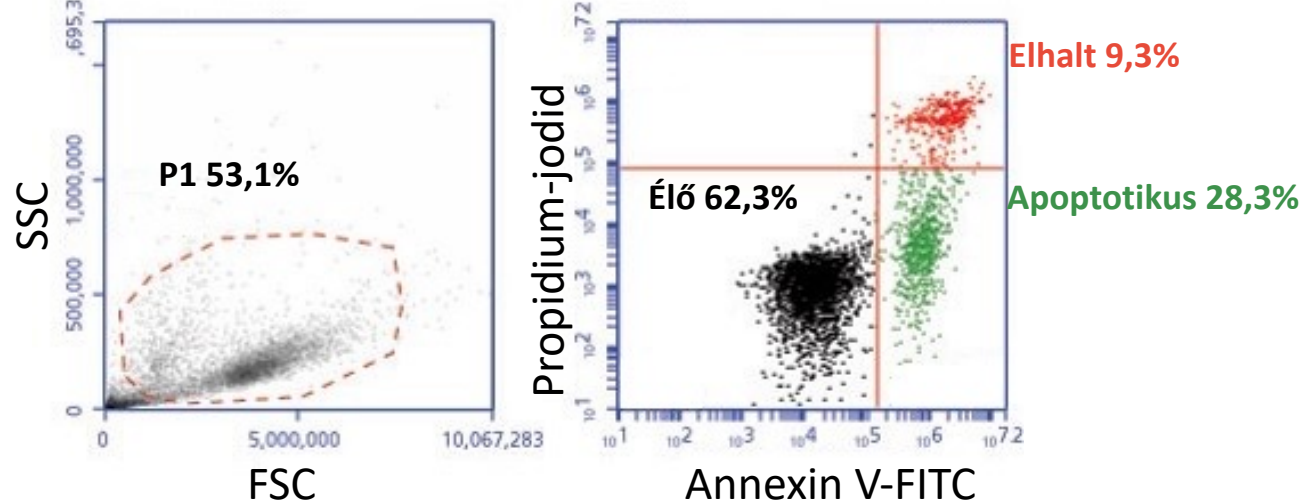
**Propidium-jodid:** DNS-t kötő fluoreszcens molekula, mely azonban az élő sejtek membránján nem jut át.

**Annexin V:** Az apoptotikus sejtek membránjában előforduló foszfatidil-szerinhez kötődik.

Jurkat-sejtek

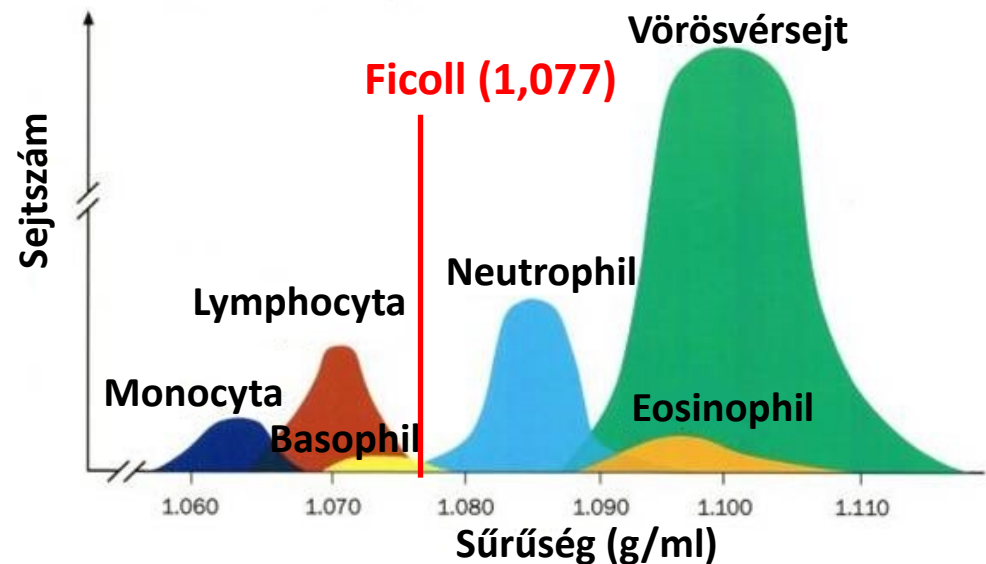


Jurkat-sejtek + camptothecin (kemoterápia)



# Mononukleáris sejtek izolálása

- **Fizikai paramétereken alapuló módszerek:**<sup>[19.]</sup>
  - Filtráció (vérszámok mérete alapján)
  - Grádiens centrifugálás (pl. **Ficoll-grádiens centrifugálás**, a vér alakos elemeinek sűrűsége alapján)

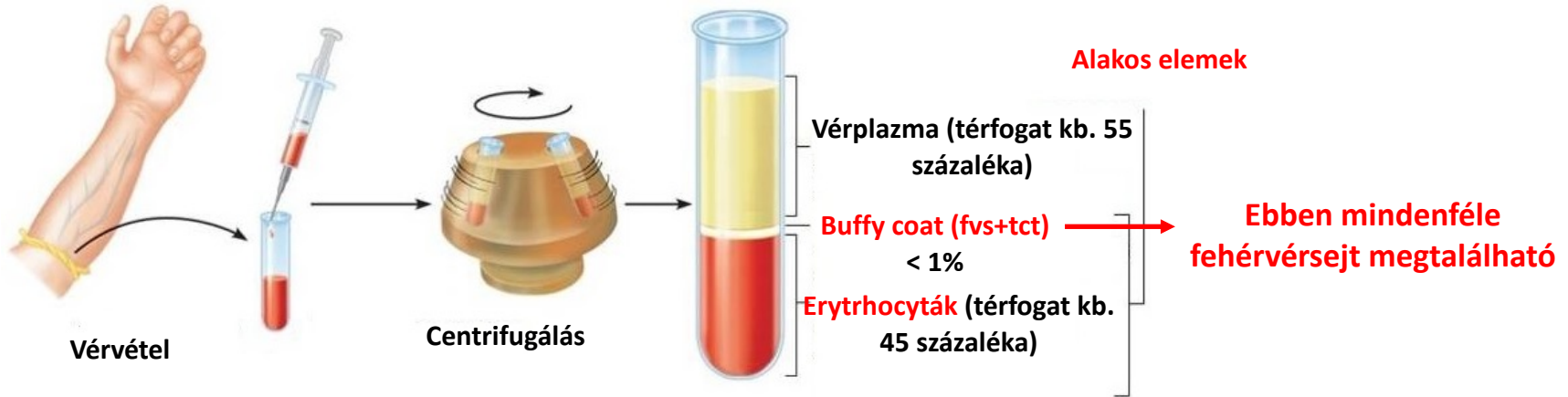


- **Adhéziós tulajdonságokon alapuló eljárások:**
  - Nylon vatta: monocyták és a B-sejtek kitapadnak
  - Műanyag/üvegfelszín: monocyták kitapadnak, lymphocyták eltávolíthatók

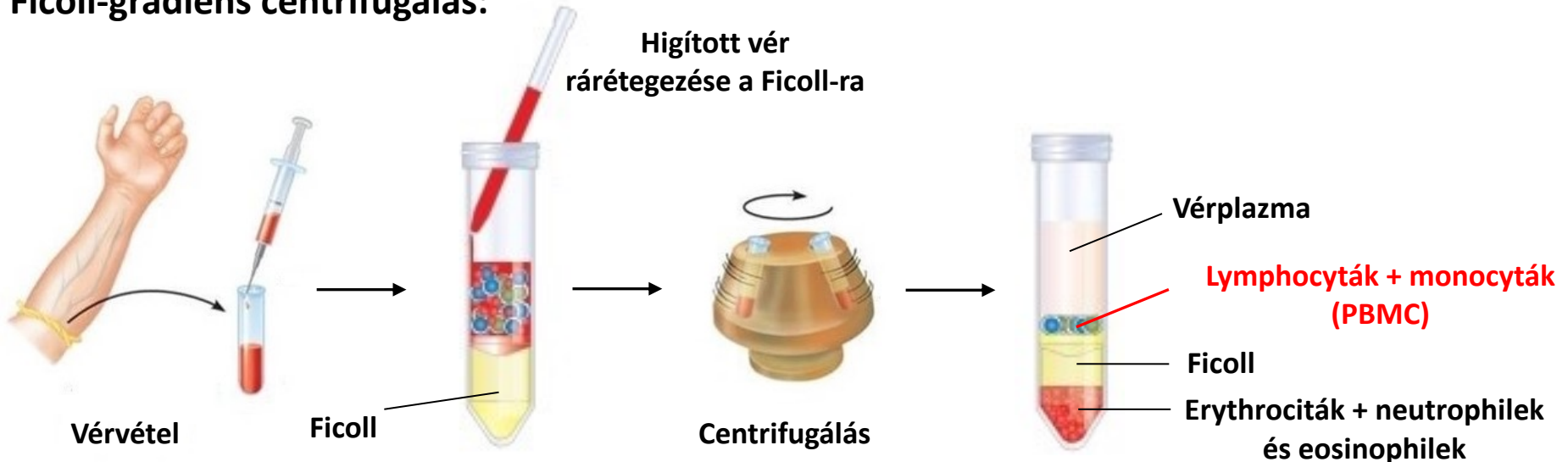


# Ficoll-grádiens centrifugálás 1.

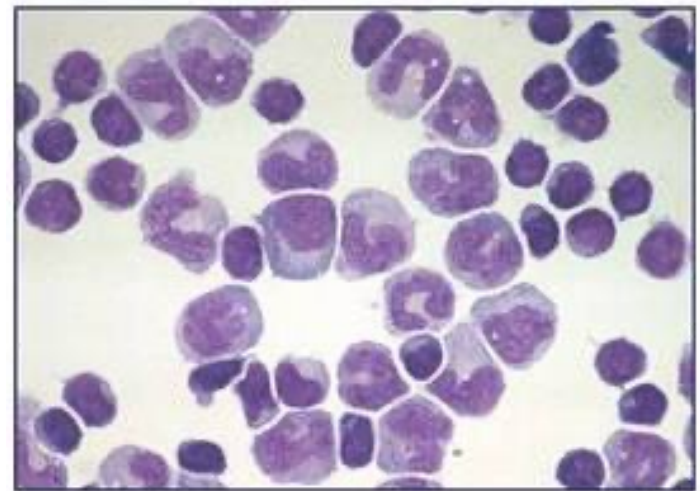
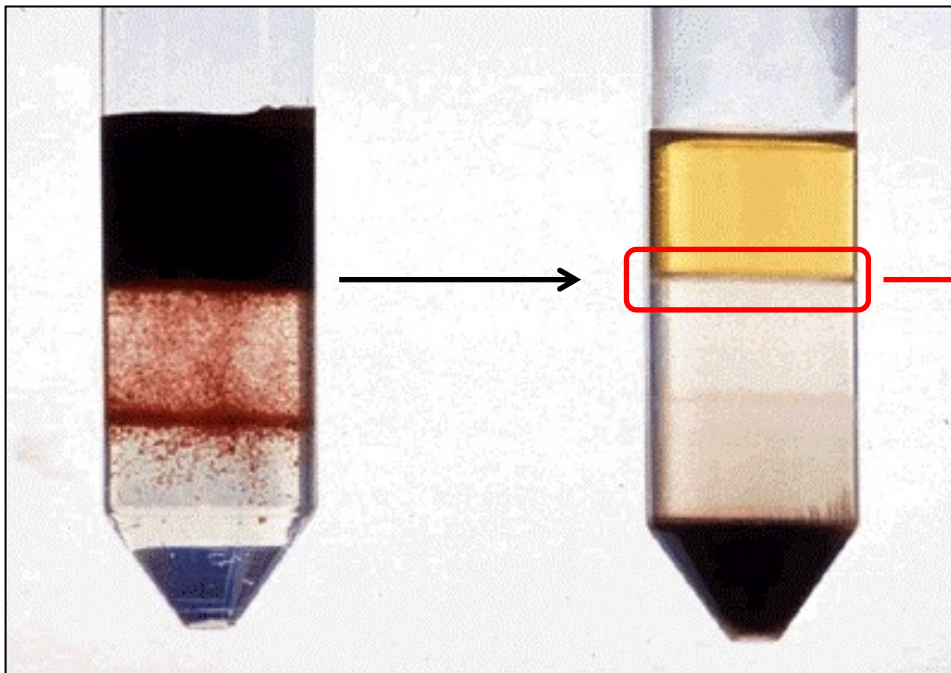
Közönséges centrifugálás:



Ficoll-grádiens centrifugálás:



# Ficoll-grádiens centrifugálás 2.



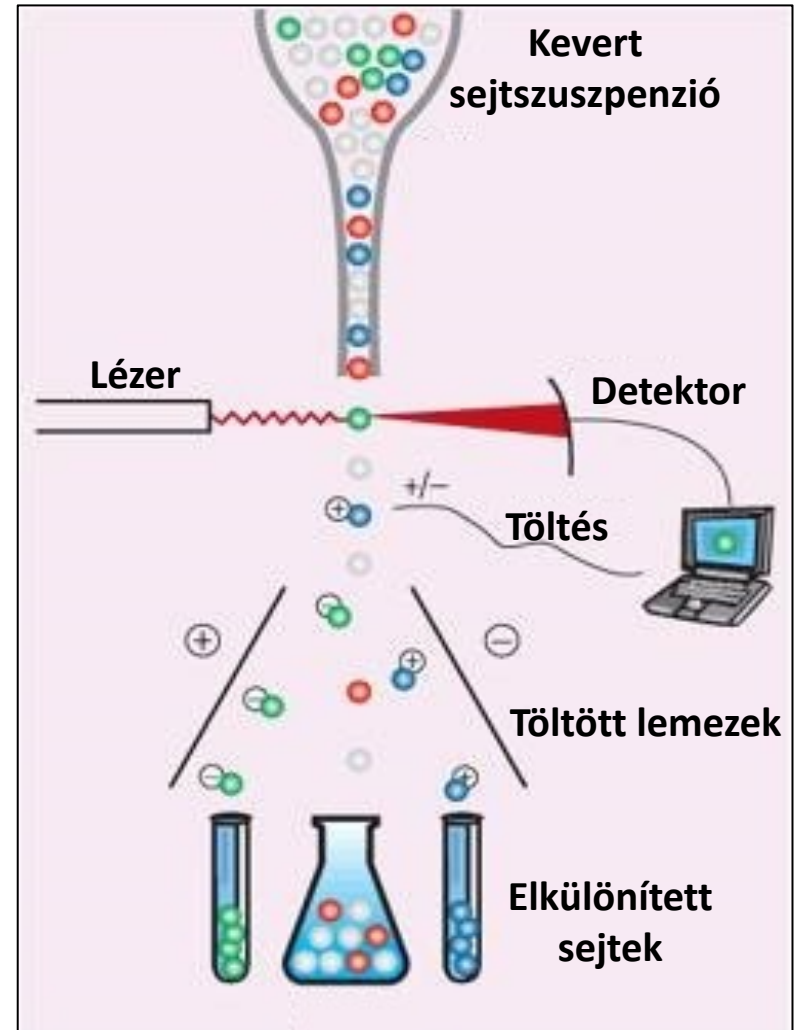
Perifériás vér mononukleáris sejtjei (**PBMC**, Peripheral blood mononuclear cells = nem-szegmentált magvú fehérvérsejtek): **Lymphocyták, monocyták** (és kis arányban basophil granulocyták)<sup>[20.]</sup>

# Szortolás

Szortolás: áramlási citometrián alapuló **sejtelválasztó technika**

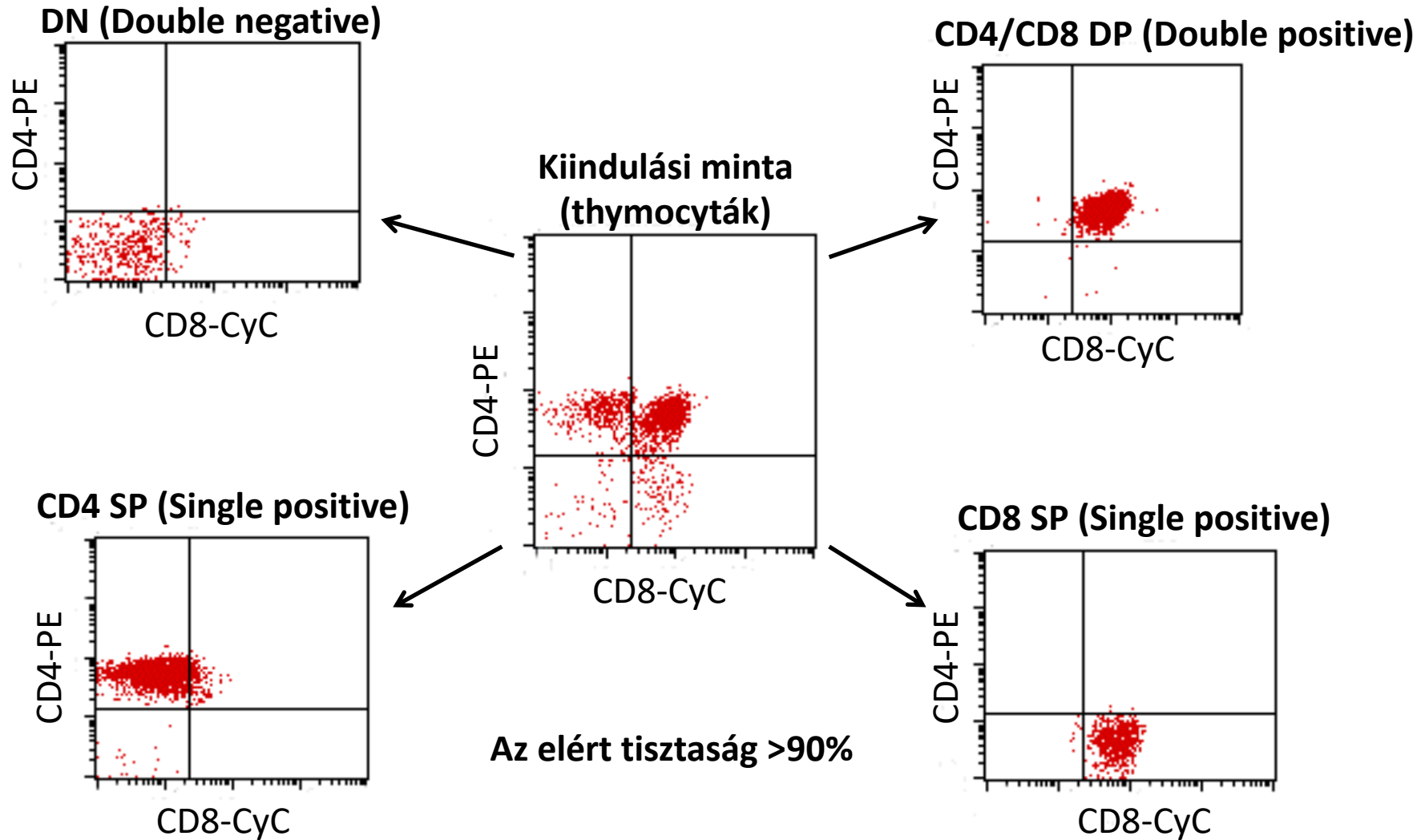
**FACS:** Fluoreszcencia-aktivált sejt szortálás  
(Fluorescence activated cell sorting)

1. A sejtek egyesével egy-egy folyadékcseppbe kerülnek.
2. A fluoreszcensen jelölt sejt elhalad a lézer előtt, a szórt és az emittált fényt a detektorok mérik.
3. A cseppek a beállított paramétereiktől függően elektromos töltést kapnak.
4. A cseppeket eltérítik a pozitív és negatív töltéssel bíró lemezek.
5. A sejteket tartalmazó eltérített cseppek külön csövekbe kerülnek.



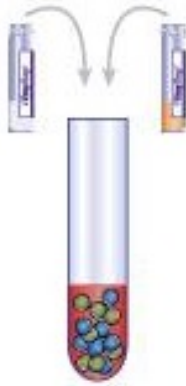
Az elkülönített sejtek életképesek és felhasználhatók

# Szortolás egér thymusból



# Immunomágneses sejtszeparálás (MACS)

1. Antitest keverék



2. Mágneses gyöngy

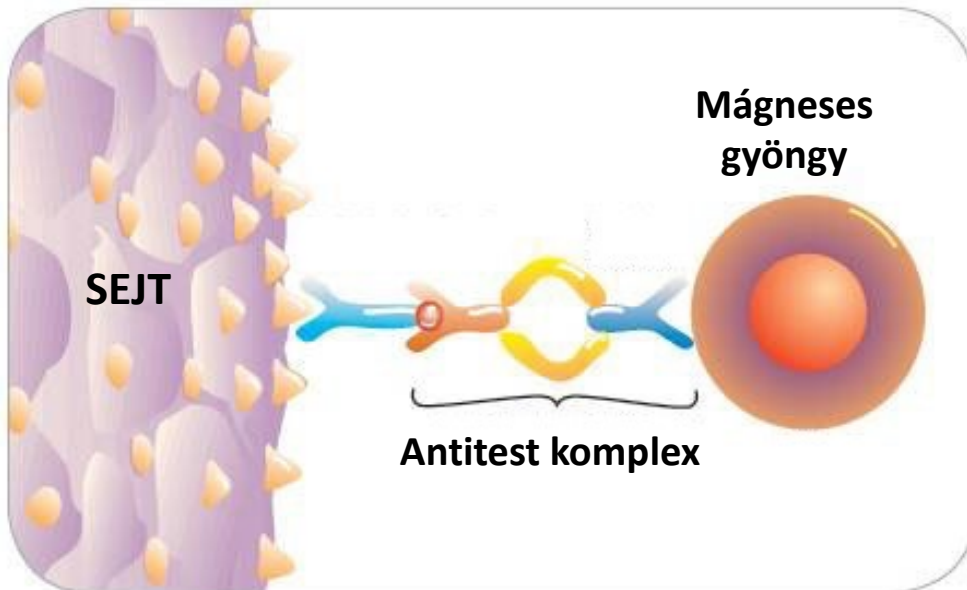
3. Inkubáció



5. Felülúszó leöntése

**Pozitív szelekció:** Csőhöz tapadt jelölt sejtek

**Negatív szelekció:** Felülúszóban lévő jelöletlen sejtek



A Stemcell Technologies™  
EasySep™ mágnesese.

# Hivatkozások 1.

1. BD Biosciences: **BD FACSCanto II** ([https://www.bdbiosciences.com/documents/facscanto\\_techsspecs.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/facscanto_techsspecs.pdf))
2. McCoy JP Jr<sup>1</sup>: **Basic principles of flow cytometry.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002 Apr;16(2):229-43.
3. BD Biosciences: **BD FACSCalibur** ([https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur\\_brochure.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf))
4. Addison EG<sup>1</sup>, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, Malayeri R, Wickremasinghe RG, Davies JK, Lowdell MW: **Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.** *Immunology.* 2005 Nov;116(3):354-61.
5. Campbell JP<sup>1</sup>, Guy K, Cosgrove C, Florida-James GD, Simpson RJ: **Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise.** *Brain Behav Immun.* 2008 Mar;22(3):375-80. Epub 2007 Oct 18.
6. Altin JG<sup>1</sup>, Sloan EK: **The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation.** *Immunol Cell Biol.* 1997 Oct;75(5):430-45.
7. Létourneau S<sup>1</sup>, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: **IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets.** *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):758-62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011.
8. Craig FE<sup>1</sup>, Foon KA: **Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.** *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):3941-67. doi: 10.1182/blood-2007-11-120535. Epub 2008 Jan 15.
9. Virgo PF<sup>1</sup>, Gibbs GJ: **Flow cytometry in clinical pathology.** *Ann Clin Biochem.* 2012 Jan;49(Pt 1):17-28. doi: 10.1258/acb.2011.011128. Epub 2011 Oct 25.
10. O'Gorman MR<sup>1</sup>, Zollett J, Bensen N: **Flow cytometry assays in primary immunodeficiency diseases.** *Methods Mol Biol.* 2011;699:317-35. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5\_15.

# Hivatkozások 2.

11. Maguire O<sup>1</sup>, Tario JD Jr, Shanahan TC, Wallace PK, Minderman H: **Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match.** *Immunol Invest.* 2014;43(8):756-74. doi: 10.3109/08820139.2014.910022.
12. Bray RA<sup>1</sup>, Tarsitani C, Gebel HM, Lee JH: **Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection.** *Methods Cell Biol.* 2011;103:285-310. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00012-7.
13. Darzynkiewicz Z<sup>1</sup>, Halicka HD, Zhao H: **Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry.** *Adv Exp Med Biol.* 2010;676:137-47.
14. Lehmann AK<sup>1</sup>, Sornes S, Halstensen A: **Phagocytosis: measurement by flow cytometry.** *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):229-42.
15. June CH<sup>1</sup>, Abe R, Rabinovitch PS: **Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry.** *Curr Protoc Cytom.* 2001 May;Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142956.cy0908s02.
16. Morgan E<sup>1</sup>, et al.: **Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology.** *Clin Immunol.* 2004 Mar;110(3):252-66.
17. Tomlinson MJ<sup>1</sup>, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J: **Cell separation: Terminology and practical considerations.** *J Tissue Eng.* 2013;4:2041731412472690. doi: 10.1177/2041731412472690. Epub 2012 Dec 28.
18. Ashraf Tabll<sup>1</sup> and Hisham Ismail<sup>2,3</sup>: **The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma** (<http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/the-use-of-flow-cytometric-dna-ploidy-analysis-of-liver-biopsies-in-liver-cirrhosis-and-hepatocellul>)
19. Fuss IJ<sup>1</sup>, Kanof ME, Smith PD, Zola H: **Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood.** *Curr Protoc Immunol.* 2009 Apr;Chapter 7:Unit7.1. doi: 10.1002/0471142735.im0701s85.
20. Mitre E<sup>1</sup>, Taylor RT, Kubofcik J, Nutman TB: **Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections.** *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2439-45.